

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 1 日 (01.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/080575 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, 7/01, C12Q 1/02, 1/68, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/567, C07K 16/08, A61K 35/76, A61P 37/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003232

(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 21 日 (21.02.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-045489 2004 年 2 月 20 日 (20.02.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人東京都医学研究機構 (TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒1638001 東京都新宿区西新宿二丁目 8 番 1 号 Tokyo (JP). 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町二丁目 2 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 脇田 隆字 (WAKITA, Takaji) [JP/JP]; 〒1750094 東京都板橋区成増 3 丁目 3 7 番 1 号 302 号室 Tokyo (JP). 加藤 孝宣 (KATO, Takanobu) [JP/JP]; 〒4670004 愛知県名古屋市中区瑞穂区松月町 1 丁目 4 1 番地 エミネンス石川橋 206 号 Aichi (JP). 伊達 朋子 (DATE, Tomoko) [JP/JP]; 〒2110044 神奈川県川崎市中原区新城 3 丁目 1 3 番 5 号 テラス新城 303 号室 Kanagawa (JP). 宮本 道子 (MIYAMOTO, Michiko) [JP/JP]; 〒1830032 東京都府中市本宿町 1 丁目 3 2 番 1 号 サンライズ

ヒル 7-202 号室 Tokyo (JP). 田邊 純一 (TANABE, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒2510874 神奈川県藤沢市花の木 9 番 5 号 101 号室 Kanagawa (JP). 曾根 三郎 (SONE, Saburo) [JP/JP]; 〒2440817 神奈川県横浜市戸塚区吉田町 1120-3 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT ビル 19 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACID CONSTRUCT CONTAINING FULL-LENGTH GENOME OF HUMAN HEPATITIS C VIRUS, RECOMBINANT FULL-LENGTH VIRUS GENOME REPLICATIVE CELL HAVING THE NUCLEIC ACID CONSTRUCT TRANSFERRED THEREINTO AND METHOD OF CONSTRUCTING HEPATITIS C VIRAL PARTICLES

(54) 発明の名称: ヒト C 型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びに C 型肝炎ウイルス粒子の作製方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of efficiently replicating RNA containing the full-length genome sequence of HCV; a method of preparing viral particles of HCV containing full-length HCV replicon RNA or full-length HCV genome RNA by using a cell culture system; a method of producing hepatitis C viral particles which comprises culturing cells having replicon RNA comprising the full-length RNA sequence of hepatitis C virus of the genotype 2a and a base sequence containing at least one selection marker and/or at least one reporter gene and at least one IRES sequence or the full-length genome RNA of hepatitis C virus of the genotype 2a to thereby allowing the production of viral particles in the culture medium; a hepatitis C vaccine; and an antibody against hepatitis C viral particles.

(57) 要約: 本発明は、HCV 全長ゲノム配列を含む RNA を効率良く複製する方法、及び全長 HCV レプリコン RNA 又は全長 HCV ゲノム RNA を含有する HCV ウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法を提供する。また本発明は、遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルスの全長ゲノム RNA 配列と、少なくとも 1 つの選択マーカー遺伝子及び/又は少なくとも 1 つのリポーター遺伝子と、少なくとも 1 つの IRES 配列とを含む塩基配列からなるレプリコン RNA、あるいは遺伝子型 2a の C 型肝炎ウイルスの全長ゲノム RNA を導入した細胞を培養して、培養物中にウイルス粒子を産生させることを含む、C 型肝炎ウイルス粒子の製造方法に関する。さらに本発明は、C 型肝炎ワクチン及び C 型肝炎ウイルス粒子に対する抗体にも関する。

WO 2005/080575 A1

明 細 書

ヒトC型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物及び該核酸構築物を導入した組換え全長ウイルスゲノム複製細胞、並びにC型肝炎ウイルス粒子の作製方法

5

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルスの全長ゲノムを含む核酸構築物、C型肝炎ウイルス粒子のin vitroでの作製方法、及び作製したC型肝炎ウイルス粒子の使用に関する。

10

背景技術

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus、HCV) は、フラビウイルス科に属する、一本鎖の(+)鎖センスRNAをゲノムとするウイルスであり、C型肝炎の原因となることが知られている。

15 HCVは持続的に感染することにより慢性肝炎を引き起こす。現在、世界的規模で認められる慢性肝炎の主たる原因がHCV持続感染である。実際、持続感染者の50%程度が慢性肝炎を発症し、そのうち約20%の患者が10年～20年を経て肝硬変に移行し、さらにその一部は肝癌といった致死的な病態へと進展する。

20 C型肝炎に対する現在の主な治療は、インターフェロナー α 、インターフェロナー β 、及びインターフェロナー α とプリヌクレオシド誘導体であるリバビリンとの併用療法により行われている。しかしながら、これらの治療を行っても、全治療者の約60%に治療効果が認められるだけであり、効果が出た後に治療を中止すると半分以上の患者が再燃する。

25 工業国において罹患率が高く、最終的に深刻な結果を招き、かつ現在は原因治療が存在しないC型肝炎に対する効果的な治療薬又は予防薬の開発は重要な目標である。そのため、HCV特異的な化学療法、ワクチン療法の発展が切望されている。抗HCV薬開発のターゲットとしては、HCVの複製抑制やHCVの細胞感染の抑制が考えられる。

最近になって、HCV由来の自律複製能を有するRNAとして、HCVサブゲノムRNAレ

プリコンシステムが作製された（特許文献1、2及び3、非特許文献1～4）。
HCVサブゲノムRNAレプリコンシステムは、HCVゲノムの構造遺伝子を取り除いて
代わりに選択薬剤マーカー遺伝子を挿入したHCVレプリコンRNAを作製し、そのレ
プリコンRNAを培養細胞内に導入し、細胞内でレプリコンRNAを自律的に複製させ
5 るシステムである。これにより、培養細胞を用いてHCVの複製機構を解析するこ
とが可能になったが、これはHCVウイルスの増殖複製過程におけるウイルスRNA複
製のみを評価することが可能な実験系であり、HCVウイルス粒子の感染細胞内
での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程は解析できない。

現在、HCVウイルス粒子の形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染
10 という過程を評価する方法としては、チンパンジーなどの動物を用いた実験系し
かない（非特許文献5）。しかしながら、動物という生体をそのまま用いた実験
系は、煩雑で解析が極めて困難である。したがって、HCVウイルス粒子の感染細
胞内での形成と細胞外への放出、さらに新たな細胞への感染という過程を解析お
よび、これらの過程の阻害を作用メカニズムとした抗HCV薬を作製するには、こ
15 れらの過程を再現できる極めて単純化した実験系、すなわち、培養実験系での
HCVウイルス粒子の作製系を構築する必要がある。

また、細胞培養系を用いて安定してHCVウイルス粒子を供給可能になれば、ウ
イルスを弱毒化したり、分子生物学的手法を用いて非感染性のHCVウイルスを作
製したりして、それをワクチンに用いることができる。

20 特許文献1 特開2001-17187号公報

特許文献2 国際出願PCT/JP03/15038

特許文献3 特願2003-329082

非特許文献1 Lohmann et al., Science, (1999) 285, p. 110-113

非特許文献2 Blight et al., Science, (2000) 290, p. 1972-1974

25 非特許文献3 Friebe et al., J. Virol., (2001) 75(24): p. 12047-
12057

非特許文献4 Ikeda et al., J. Virol., (2002) 76(6): p. 2997-3006

非特許文献5 Kolykhalov et al., Science, (1997) 277, p. 570-574

非特許文献6 Kato et al., Gastroenterology, (2003) 125, p. 1808-1817

非特許文献 7 Yanagi et al., Proc.Natl.Acad.Sci., (1997) 96(16):
p. 8738-8743

非特許文献 8 Okamoto et al., J.Gen.Virol., (1991) 73, p 2697-26704

非特許文献 9 Aoyagi et al., J. Clin. Microbiol., (1999) 37(6):
5 p. 1802-1808

発明の開示

本発明は、これまで成功していない、HCV全長ゲノム配列を含むRNAを効率良く複製する方法、及び全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを含有するHCV
10 ウイルス粒子を細胞培養系により製造する方法、を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製する方法を開発した。すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タン
15 パク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカ―遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基
20 配列からなる、レプリコンRNA。

このレプリコンRNAにおいては、好ましくは、前記塩基配列が、前記の5'非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカ―遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タン
25 パク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域を、5'から3'方向へこの順番で含む。

このレプリコンRNAのより好ましい実施形態では、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAである。

このレプリコンRNAのさらに好ましい実施形態では、5' 非翻訳領域が配列番号 1 に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号 2 に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号 3 に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号 4 に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号 5 に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号 6 に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号 7 に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号 8 に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号 9 に示す塩基配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号 10 に示す塩基配列からなり、3' 非翻訳領域が配列番号 11 に示す塩基配列からなる。

[2] 以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号 13 に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号 13 に示す塩基配列において 1 ～ 100 個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

[3] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを細胞に導入することを含む、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

この方法では、細胞が増殖性細胞であることが好ましい。あるいは、この方法における細胞は、真核細胞であることが好ましい。

この方法では、好ましくは、真核細胞はヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である。さらに好ましくは、真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である。

[4] 上記[3]記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

[5] 上記[4]記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

[6] 上記[5]記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

[7] 上記[4]記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

[8] 上記[7]記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

[9] 被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 上記[4]記載の細胞

(b) 上記[8]記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

- 5 (c) 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出することを含む、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

10 [10] 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を含有するC型肝炎ワクチン。

[11] 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

[12] 上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

- 15 [13] 上記[12]に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

[14] 外来遺伝子をコードするRNAを上記[1]又は[2]記載のいずれかのレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含む、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

20 [15] 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含む、該RNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

[16] 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

[17] 細胞が増殖性細胞である、上記[15]又は[16]記載の方法。

25 [18] 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法。

[19] 上記[6]記載のC型肝炎ウイルス粒子に対する抗体。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2004-045489号の明細書及び図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを作製するための
の鋳型DNAの構築手順を示す概略図である。図 1 の上段は、T7プロモーターの下
5 流に全長HCVゲノムを挿入して作製したプラスミドクローンpJFH1の構造を示す。

図 1 の下段は、pJFH1のT7プロモーターと5'非翻訳領域の下流にネオマイシン耐
性遺伝子とEMCV IRESを含むDNA断片を挿入した、全長HCVゲノム配列を含むプラ
スミドクローンpFGREP-JFH1の構造を示す。図中の記号は以下のとおりである。

T 7： T7 RNAプロモーター、5' U T R： 5'非翻訳領域、C： コアタンパク質、

10 E 1、E 2： エンベロープタンパク質。NS 2、NS 3、NS 4 A、NS 4 B、
4 A、4 B： 非構造タンパク質。3' U T R： 3'非翻訳領域。Age I、Pme I、Xba
I： 制限酵素Age I、Pme I及びXba Iの切断部位。G D D： NS5Bタンパク質の活性
中心に相当するアミノ酸モチーフG D Dの位置。n e o： ネオマイシン耐性遺伝
子、E M C V I R E S： EMCV IRES（脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部
15 位）。

図 2 は、全長HCVゲノムRNAであるrJFH-1を導入したHuh7細胞におけるrJFH-1の
複製を示すノーザンブロット解析の結果を示す写真である。

図 3 は、培地中のHCVコアタンパク質の定量の結果を示す。白抜きの円はrJFH1
を導入した細胞、黒塗りの円はrJFH1/GNDを導入した細胞を示す。

20 図 4 は、rJFH-1を導入したHuh7細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画し
た各画分についての、HCVコアタンパク質量及び全長HCVゲノムRNA量、並びに比
重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア (core) タンパク質、白抜きの円は
全長HCVゲノムRNA、網掛けの円は比重を示す。

図 5 は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1をトランスフェクションし
25 たHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

図 6 は、rFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全
長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンにおける、全長HCVレプリコンRNAの複製を
示す写真である。

図 7 は、ゲノムDNA中へのネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を確認す

るための、宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とし、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマーを用いてPCR増幅した結果を示す写真である。M：DNAサイズマーカー、P：陽性対照、N：Huh7細胞。

図8は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるcoreタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図9は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS3タンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図10は、全長HCVレプリコンRNAであるrFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞におけるNS5Aタンパク質の発現を示すウェスタンブロット解析の結果を示す写真である。

図11は、rFGREP-JFH1を導入したHuh7細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画した各画分についての、HCV coreタンパク質の量及び全長HCVレプリコンRNA量、並びに比重を示すグラフである。黒塗りの円はHCV コア(core)タンパク質、白抜きの円は全長HCVレプリコンRNA、網掛けの円は比重を示す。

図12は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清に含まれるウイルス粒子を添加したHuh7細胞のコロニー形成を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

20 1. 全長HCVレプリコンRNA

C型肝炎ウイルス（HCV）のゲノムは、約9600ヌクレオチドからなる(+)鎖の一本鎖RNAである。このゲノムRNAは、5' 非翻訳領域（5' NTR又は5' UTRとも表記する）、構造領域と非構造領域とから構成される翻訳領域、及び3' 非翻訳領域（3' NTR又は3' UTRとも表記する）からなる。その構造領域にはHCVの構造タンパク質がコードされており、非構造領域には複数の非構造タンパク質がコードされている。

このようなHCVの構造タンパク質（core、E1、及びE2）と非構造タンパク質（NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、及びNS5B）は、翻訳領域から一続きのポリプロテインとして翻訳された後、プロテアーゼによる限定分解を受けて遊離、生成さ

れる。これらの構造タンパク質及び非構造タンパク質（すなわち、HCVのウイルスタンパク質）のうち、coreはコアタンパク質であり、E1及びE2はエンベロープタンパク質である。非構造タンパク質はウイルス自身の複製に関与するタンパク質であり、NS2はメタロプロテアーゼ活性、NS3はセリンプロテアーゼ活性（N末端側の3分の1）とヘリカーゼ活性（C末端側の3分の2）を有することが知られている。さらに、NS4AはNS3のプロテアーゼ活性に対するコファクターであり、NS5BはRNA依存RNAポリメラーゼ活性を有することも報告されている。

本発明者らは、HCVゲノムRNAを用いて、自律的に複製可能であり、かつウイルス粒子産生能を有するレプリコンRNAを構築した。

本明細書では、自律複製能を有しておりHCVゲノムRNAを改変して作製されたRNAを、「レプリコンRNA」又は「RNAレプリコン」と称する。本明細書においてHCV由来のレプリコンRNAは、HCV-RNAレプリコンとも称する。本明細書では、HCVゲノムRNAの全長を含む本発明のレプリコンRNAを、「全長HCVレプリコンRNA」と呼ぶ。本発明の全長HCVレプリコンRNAは、ウイルス粒子産生能を有する。

本発明の全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態では、C型肝炎ウイルスは、限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであることが好ましい。本発明において、「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」とは、Simmondsら（Simmonds, P. et al, Hepatology, (1994) 10, p. 1321-1324を参照）による国際分類に従って遺伝子型2aと同定されるC型肝炎ウイルスを意味する。本発明における「遺伝子型2aのC型肝炎ウイルス」「遺伝子型2aのHCV」には、天然由来のHCVゲノムRNAを有するウイルスだけでなく、天然由来のHCVゲノム配列に人為的な改変を加えたゲノムRNAを有するウイルスも包含する。遺伝子型2aのHCVの具体例としては、JFH-1株（特開2002-171978号公報を参照）が挙げられる。

本明細書において「C型肝炎ウイルスのゲノムRNA」とは、C型肝炎ウイルスの一本鎖の(+)鎖センスRNAからなるゲノムの全長にわたる塩基配列を有するRNAを意味する。限定するものではないが、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAとしては、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAが好ましい。

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの一つの実施形態は、C型肝炎ウイルスの

ゲノムRNA上の、5' 非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3' 非翻訳領域と、少なくとも
5 1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNAである。

限定するものではないが、好ましくは、本発明の全長HCVレプリコンRNAは、5' 非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、
10 E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3' 非翻訳領域を、5' から3' 方向へこの順番で含む。

本明細書において、「5' 非翻訳領域 (5' NTR又は5' UTR) 」、「coreタンパク質
15 コード配列 (core領域又はC領域) 」、「E1タンパク質コード配列 (E1領域) 」、「E2タンパク質コード配列 (E2領域) 」、「NS2タンパク質コード配列 (NS2領域) 」、「NS3タンパク質コード配列 (NS3領域) 」、「NS4Aタンパク質コード配列 (NS4A領域) 」、「NS4Bタンパク質コード配列 (NS4B領域) 」、「NS5Aタンパク質コード配列 (NS5A領域) 」、「NS5Bタンパク質コード配列 (NS5B領域) 」、「
20 及び「3' 非翻訳領域 (3' NTR又は3' UTR) 」、並びにその他の特定の領域若しくは部位は、遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスであるJFH-1株 (特開2002-171978号公報) のゲノムの全領域からなる全長ゲノムRNA (配列番号12) を基準として定めることができる。

あるいは、本願発明におけるC型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム中の部分領域又はその部位は、JFH-1株のゲノムRNA (配列番号12) の部分塩基配列である配列
25 番号1～11に示す配列を基準として定めることもできる。JFH-1株の全長ゲノムRNA (JFH-1クローン由来) (配列番号12) の「5' 非翻訳領域」は、配列番号1に示す塩基配列からなる。また、「coreタンパク質コード配列」は配列番号2に示す塩基配列からなる。「E1タンパク質コード配列」は、配列番号3に示す塩

基配列からなる。「E2タンパク質コード配列」は、配列番号4に示す塩基配列からなる。「NS2タンパク質コード配列」は、配列番号5に示す塩基配列からなる。

「NS3タンパク質コード配列」は、配列番号6に示す塩基配列からなる。「NS4Aタンパク質コード配列」は、配列番号7に示す塩基配列からなる。「NS4Bタンパク質コード配列」は、配列番号8に示す塩基配列からなる。「NS5Aタンパク質コード配列」は、配列番号9に示す塩基配列からなる。「NS5Bタンパク質コード配列」は、配列番号10に示す塩基配列からなる。「3'非翻訳領域」は、配列番号11に示す塩基配列からなる。

例えば、HCV由来のRNA配列中の領域又は部位は、そのRNA配列を配列番号1～12に示す塩基配列に対してアラインメントし、配列番号1～12の配列中の塩基番号を基準として定めてもよい。このようなアラインメントにおいては、配列間でギャップ、付加、欠失、置換等が存在していてもよい。

本発明のさらなる好適な実施形態では、本発明の全長HCVレプリコンRNAに含まれる5'非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3'非翻訳領域が、それぞれ配列番号1～11に示す塩基配列を有することが好ましい。

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAの好適な実施形態は、配列番号1～11に示す塩基配列と、少なくとも1つの選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、からなるレプリコンRNAである。

本発明において「選択マーカー遺伝子」とは、その遺伝子が発現された細胞だけが選択されるような選択性を細胞に付与することができる遺伝子を意味する。

選択マーカー遺伝子の一般的な例としては抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。本

発明において好適な選択マーカー遺伝子の例としては、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ピリチアミン耐性遺伝子、アデニルルトランスフェラーゼ遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などが挙げられるが、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子が好ましく、ネオマイシン耐性遺伝子がさらに好ましい。但し本発明におけ

る選択マーカー遺伝子はこれらに限定されるものではない。

また本発明において「リポーター遺伝子」とは、その遺伝子発現の指標となる遺伝子産物をコードするマーカー遺伝子を意味する。リポーター遺伝子の一般的な例としては、発光反応や呈色反応を触媒する酵素の構造遺伝子が挙げられる。

- 5 本発明において好適なリポーター遺伝子の例としては、トランスポゾンTn9由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、大腸菌由来の β グルクロニダーゼ若しくは β ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、緑色蛍光タンパク質遺伝子、クラゲ由来のエクオリン遺伝子、分泌型胎盤アルカリフォスファターゼ（SEAP）遺伝子等が挙げられる。但し本発明におけるリポーター
- 10 一遺伝子はこれらに限定されるものではない。

上記の選択マーカー遺伝子やリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNA中にどちらか一方のみが含まれていてもよいし、両方が含まれていてもよい。選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子は、全長HCVレプリコンRNAに1つ含まれていてもよいし、2つ以上含まれていてもよい。

- 15 本発明における「IRES配列」とは、RNAの内部にリボソームを結合させて翻訳を開始させることが可能な内部リボソーム結合部位を意味する。本発明におけるIRES配列の好適な例としては、以下に限定するものではないがEMCV IRES（脳心筋炎ウイルスの内部リボソーム結合部位）、FMDV IRES、HCV IRES、等が挙げられるが、EMCV IRES、及びHCV IRESがより好ましく、EMCV IRESが最も好ましい。

- 20 本発明に係る全長HCVレプリコンRNAのさらに好ましい1つの実施形態は、配列番号13に示す塩基配列からなるRNAである。さらに、この配列番号13に示す塩基配列において、1～100個、好ましくは1～30個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～6個、最も好ましくは1～数個（2～5個）の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、かつ、自律複製
- 25 能及びウイルス粒子産生能を有するRNAも、好適な実施形態として本発明の全長HCVレプリコンRNAの範囲に含まれる。

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、その全長HCVレプリコンRNAを導入する細胞内で発現させたい任意の外来遺伝子をコードするRNAをさらに含んでもよい。外来遺伝子をコードするRNAは、5'非翻訳領域の下流に連結してもよいし、選択

マーカ―遺伝子若しくはリポーター遺伝子の上流又は下流に連結させてもよいし、3′非翻訳領域の上流に連結してもよい。また、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、及びNS5Bタンパク質コード配列のいずれかの間に挿入してもよい。

外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、導入された細胞内で翻訳される際に、該外来遺伝子にコードされる遺伝子産物を発現することができる。従って外来遺伝子をコードするRNAを含む全長HCVレプリコンRNAは、外来遺伝子の遺伝子産物を細胞内で生成させることを目的とする場合にも、好適に使用することができる。

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、リボザイムを含んでいてもよい。全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカ―遺伝子及び／又はリポーター遺伝子の下流にリボザイムを連結しておき、そのリボザイムの自己切断活性によって、選択マーカ―遺伝子及び／又はリポーター遺伝子が、IRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3′非翻訳領域から切り離されるようにすることもできる。

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAにおいては、上述したような選択マーカ―遺伝子及び／若しくはリポーター遺伝子、ウイルスタンパク質をコードする配列、並びに外来遺伝子又はリボザイム等が、全長HCVレプリコンRNAから正しい読み枠で翻訳されるように連結される。全長HCVレプリコンRNAにコードされるタンパク質は、一続きのポリペプチドとして翻訳され発現された後でプロテアーゼによって各タンパク質へと切断され、遊離するように、プロテアーゼ切断部位等を介して互いに連結させることが好ましい。

本発明はまた、本願発明のレプリコンRNAをコードするDNAベクター、好ましくは発現ベクターにも関する。

なお、本発明においてRNAが「自律複製能を有する」とは、RNAを細胞中に導入

したときに、そのRNAが自己増殖することを意味する。限定するものではないが、RNAの自律複製能は、例えば、対象とするRNAをHuh7細胞中にトランスフェクションし、そのHuh7細胞を培養し、得られる培養物中の細胞から抽出したRNAについて、導入したRNAを特異的に検出可能なプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーションによりRNAを検出することによって、確認することができる。自律複製能を確認するための具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNAの検出等の記載に例示されている。

さらに本発明において、RNAが「ウイルス粒子産生能を有する」とは、そのRNAを細胞（例えば、Huh7細胞などの培養細胞）に導入したときに、該細胞中でウイルス粒子が産生されることを意味する。ウイルス粒子産生能は、例えば、対象とするRNAを導入した細胞の培養上清について、そのRNAに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法での検出を行う方法、又はその培養上清をショ糖濃度勾配法にかけてウイルス粒子を分離し、HCVタンパク質を検出する方法などにより、確認することができる。これらの具体的な操作は、本明細書の実施例に記載されたコロニー形成能の測定、HCVタンパク質の発現確認、レプリコンRNAの検出等の記載に例示されている。

2. 全長HCVレプリコンRNAの作製

本発明に係る全長HCVレプリコンRNAは、当業者に公知である任意の遺伝子工学的手法を用いて作製することができる。限定するものではないが、全長HCVレプリコンRNAは、例えば遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスとしてJFH-1株を用いる場合には以下のような方法で作製することができる。

まず、JFH-1株のゲノム全領域のRNA（配列番号12）に対応するDNA（この配列は、国際DNAデータバンクにアクセッション番号AB047639として登録されている）を、常法により再構築してRNAプロモーターの下流に挿入して、DNAクローンを作製する。ここで、「RNAに対応するDNA」とは、当該RNAの塩基配列のU（ウラシル）をT（チミン）に置き換えた塩基配列からなるDNAを意味する。前記RNAプロモーターは、プラスミドクローン中に含まれるものであることが好ましい。好

適なRNAプロモーターとしては、限定するものではないが、T7 RNAプロモーター、SP6 RNAプロモーター、SP3 RNAプロモーターが挙げられるが、T7 RNAプロモーターが特に好ましい。

次に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子、並びにIRES配列をコードするDNAを上記DNAクローンに挿入する。5' 非翻訳領域の下流に、選択マーカー遺伝子及び／又はレポーター遺伝子を、さらにその下流にIRES配列を、挿入することが好ましい。

次いで、以上のようにして作製されたDNAクローンを鋳型として、RNAポリメラーゼによりRNAを合成する。RNA合成は、5' 非翻訳領域から、常法により開始させることができる。DNAクローンがプラスミドクローンの場合には、プラスミドクローンから制限酵素によって切り出したDNA断片を鋳型として用いてRNAを合成することもできる。なお、合成されるRNAの3' 末端がウイルスゲノムRNAの3' 非翻訳領域の末端と一致しており、他の配列が付加されたり削除されたりしないことが好ましい。このようにして合成されるRNAが、本発明に係る全長HCVレプリコンRNAである。

3. HCV粒子の作製

上記のようにして作製される全長HCVレプリコンRNAを細胞に導入することにより、全長HCVレプリコンRNAを複製することができ、好ましくは持続的に複製することができる（すなわち、レプリコンRNAの複製能を有する）組換え細胞を得ることができる。本明細書では、全長HCVレプリコンRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVレプリコンRNA複製細胞」と称する。

この全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、ウイルス粒子を産生することができる。産生されたウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイルス殻中に全長HCVレプリコンRNAを含有する。従って本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。すなわち本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養することにより、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。好ましくは、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、その培養物（好ましくは培養上清）中に産生されたウイルス粒子を採取すること

により、HCV粒子を取得することができる。

あるいは、HCV粒子は、全長HCVゲノムRNAを導入して得られる組換え細胞によっても産生される。本発明に係る全長HCVゲノムRNA（好ましくはJFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA、より好ましくは配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞では、その全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。本明細書では、全長HCVゲノムRNAを複製している組換え細胞を「全長HCVゲノムRNA複製細胞」と称する。この全長HCVゲノムRNA複製細胞によって産生されるウイルス粒子は、HCVのウイルスタンパク質から構成されるウイルス殻中に全長HCVゲノムRNAを含有する。すなわち、本発明の全長HCVゲノムRNAを導入した細胞から産生されるウイルス粒子は、HCV粒子である。限定するものではないが、好ましくは、JFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養することによって、HCV粒子を細胞培養系にて作製することができる。例えば、全長HCVゲノムRNA（例えば、配列番号12に示す塩基配列を有するRNA）を導入した細胞を培養し、その培養物（好ましくは、培養上清）中に産生されたHCV粒子を採取することにより、HCV粒子を取得することができる。

上記の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入する細胞としては、継代培養することが可能な細胞であれば任意の細胞を用いることができるが、真核細胞であることが好ましく、ヒト細胞であることがより好ましく、ヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞であることがさらに好ましい。これらの細胞としては、癌細胞株や幹細胞株などを含む増殖性細胞が好ましく、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞等がさらに好ましい。これらの細胞は、市販のものを利用してよいし、細胞寄託機関から入手して使用してもよいし、任意の細胞（例えば癌細胞又は幹細胞）から株化した細胞を使用してもよい。

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの細胞内への導入は、当業者には公知の任意の技術を使用して行うことができる。そのような導入法としては、例えば、エレクトロポレーション、パーティクルガン法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、マイクロインジェクション法、DEAEセファロース法等が挙げ

られるが、エレクトロポレーションによる方法が特に好ましい。

全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAは、単独で導入してもよいし、他の核酸と混合させたものを導入してもよい。導入するRNA量を一定にしながら全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAの導入量を変更したい場合には、所望の導入量の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを、導入する細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して一定のRNA総量とし、それを細胞内導入に用いればよい。細胞内導入に用いるレプリコンRNAの量は、使用する導入法に応じて決めればよいが、好ましくは1ピコグラム～100マイクログラム、より好ましくは10ピコグラム～10マイクログラムの量を使用する。

全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、全長HCVレプリコンRNAに含まれる選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の発現を利用して、選択することができる。具体的には、例えば、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を、選択マーカー遺伝子の発現により選択可能となる培地において培養すればよい。あるいは、そのような全長HCVレプリコンRNAの細胞内導入処理を施した細胞を培養した後、リポーター遺伝子（例えば、蛍光タンパク質）の発現について検出すればよい。

一例として、全長HCVレプリコンRNAにネオマイシン耐性遺伝子が選択マーカー遺伝子として含まれる場合には、その全長HCVレプリコンRNAを用いてエレクトロポレーション処理した細胞を培養ディッシュに播種し、12～72時間、好ましくは16～48時間培養した後に、培養ディッシュにG418（ネオマイシン）を0.05ミリグラム/ミリリットル～3.0ミリグラム/ミリリットルの濃度で添加し、その後、週に2回培養液を交換しながら培養を継続し、播種時から好ましくは10日間～40日間、より好ましくは14日間～28日間培養した後にクリスタルバイオレットで生存細胞を染色することにより、導入された全長HCVレプリコンRNAが複製されている細胞を、コロニーとして選択することができる。

形成されたコロニーからは、常法により細胞をクローン化することができる。こうして得られる全長HCVレプリコンRNAを複製している細胞クローンを、本明細書では「全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローン」と称する。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンを包含する。

全長HCVレプリコンRNA複製細胞については、複製された全長HCVレプリコンRNAを検出し、全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことを確認し、さらにHCVタンパク質の検出を行うことにより、実際に該細胞又は細胞クローンが全長HCVレプリコンRNAを複製していることを確認することができる。

複製された全長HCVレプリコンRNAの検出は、当業者には公知の任意のRNA検出法に従って行えばよいが、例えば、細胞から抽出したトータルRNAについて、導入された全長HCVレプリコンRNAに対して特異的なDNA断片をプローブとして用いるノーザンハイブリダイゼーション法を実施することにより検出することができる。

また全長HCVレプリコンRNA中の選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が細胞の宿主ゲノムDNAに組み込まれていないことの確認は、限定するものではないが、例えば、細胞から抽出したゲノムDNAについて該選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子の少なくとも一部を増幅するPCRを行い、その増幅産物の有無を確認することによって行うことができる。増幅産物が確認された細胞では、宿主ゲノム中に選択マーカー遺伝子又はリポーター遺伝子が組み込まれていると判断されることから、全長HCVレプリコンRNA自体は複製されていない可能性がある。この場合、全長HCVレプリコンRNAが複製されているか否かを、次に説明するHCVタンパク質の検出によって、さらに確認することができる。

HCVタンパク質の検出は、例えば、導入された全長HCVレプリコンRNAから発現されるべきHCVタンパク質に対する抗体を、細胞から抽出したタンパク質と反応させることによって行うことができる。この方法は、当業者には公知の任意のタンパク質検出法によって行うことができるが、具体的には、例えば、細胞から抽出したタンパク質試料をニトロセルロース膜にブロッティングし、それに対して抗HCVタンパク質抗体（例えば、抗NS3特異的抗体、又はC型肝炎患者から採取した抗血清）を反応させ、さらにその抗HCVタンパク質抗体を検出することによって行うことができる。細胞から抽出したタンパク質中からHCVタンパク質が検出されれば、その細胞は、全長HCVレプリコンRNAを複製し、HCVタンパク質を発現しているものと判断することができる。

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞のウイルス粒子産生能は、当業者には公知の任意のウイルス検出法に従って確認すればよい。例えば、ウイルス粒子を産生していると思われる細胞の培養上清をショ糖密度勾配により分画し、各分画の密度、HCVコアタンパク質濃度、及び全長HCVレ
5 プリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量を測定した結果、HCVコアタンパク質と全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAのピークが一致し、しかもそのピークが検出される画分の密度が、培養上清を25% NP40（ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル[Polyoxyethylene(9)Octylphenyl Ether])で処理してから分画した場合の同画分の密度と比較して軽い（例えば、1.18～1.20
10 mg）場合には、該細胞はウイルス粒子産生能を有すると判定することができる。

培養上清中に放出されたHCVウイルス粒子は、例えば、coreタンパク質、E1タンパク質、又はE2タンパク質に対する抗体を用いて検出することもできる。また、培養上清中の全長HCVレプリコンRNAを、特異的プライマーを用いたRT-PCR法により増幅して検出することによって、HCVウイルス粒子の存在を間接的に検出する
15 こともできる。

4. 本発明のHCV粒子の他の細胞への感染

本発明のHCVウイルス粒子は、細胞（好ましくはHCV感受性細胞）への感染能を有する。本発明は、全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を培養し、得られた培養物（好ましくは、培養上清）中のウイルス粒子を他の
20 細胞（好ましくはHCV感受性細胞）に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法にも関する。本発明において、HCV感受性細胞とは、HCVに対し感染性を有する細胞であり、好ましくは肝臓細胞またはリンパ球系細胞であるが、これらに限定されるものではない。具体的には、肝臓細胞としては初代
25 肝臓細胞や、Huh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、203細胞などが挙げられ、リンパ球系細胞としてはMolt4細胞や、HPB-Ma細胞、Daudi細胞などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させると、その感染細胞中では全長HCVレプリ

コンRNAが複製され、さらにウイルス粒子が形成される。全長HCVレプリコンRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子に感染した細胞は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子を発現するので、その発現を利用して選択及び／又は検出することが可能である。本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において

5 て産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、全長HCVレプリコンRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

さらに、本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCV粒子を細胞（例えば、HCV感受性細胞）に感染させることにより、その感染細胞中で全長HCVゲノムRNAが複製され、ウイルス粒子が形成される。本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたウイルス粒子を細胞に感染させることにより、

10 全長HCVゲノムRNAが細胞内で複製され、ウイルス粒子をさらに製造することができる。

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において産生されたHCVウイルス粒子は、チンパンジーなどのHCVウイルスに感染しうる動物に感染して、HCV由来の肝炎を引き起こすことができる。

15

5. 本発明の他の実施形態

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞では、全長HCVレプリコンRNAが高効率で複製される。また本発明の全長HCVゲノムRNA複製細胞でも、全長HCVゲノムRNAが高効率で複製される。従って、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いて、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを高効率で製造することができる。

20

本発明では、全長HCVレプリコンRNA複製細胞を培養し、培養物（培養細胞及び／又は培養培地）からRNAを抽出し、それを電気泳動法にかけ、分離された全長HCVレプリコンRNAを単離精製することによって、全長HCVレプリコンRNAを製造することができる。全長HCVゲノムRNA複製細胞を用いた場合にも、同様の方法で全長HCVゲノムRNAを製造することができる。このようにして製造されるRNAは、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含む。この場合、C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列は、選択マーカー遺伝子及び／又はリポーター遺伝子並びにIRES配列に

25

よって分断されていてもよい。C型肝炎ウイルスの全長ゲノム配列を含むRNAの製造方法が提供されることにより、C型肝炎ウイルスゲノムに関してより詳細な分析が可能となる。

さらに本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞は、HCVタンパク質を製造するために好適に使用することができる。HCVタンパク質の製造は、当業者に周知の任意の方法によって行えばよいが、例えば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを細胞に導入して組換え細胞を作製し、該組換え細胞を培養し、得られる培養物（培養細胞及び／又は培養培地）から常法によりタンパク質を回収することによって行えばよい。

また本発明のHCVウイルス粒子は、肝細胞指向性を有しうる。そのため本発明の全長HCVレプリコンRNAを使用して、肝細胞指向性ウイルスベクターを製造することができる。このウイルスベクターは、遺伝子治療用に好適に用いられる。本発明では、外来遺伝子をコードするRNAを全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAに組み込み、そのRNAを細胞に導入することにより、該外来遺伝子を細胞中に導入し、細胞内で複製させ、さらに発現させることができる。さらに、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNA中のE1タンパク質コード配列、及び／又はE2タンパク質コード配列を、他の生物種由来のウイルスの外殻タンパク質に変換したRNAを作製することにより、そのRNAを様々な生物種の細胞に感染させることも可能となる。この場合にも、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAにさらに外来遺伝子を組み込んで、それを、該外来遺伝子を肝細胞で発現させるための肝細胞指向性ウイルスベクターとして使用することができる。

本発明は、配列番号12に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法にも関する。

本発明は、本発明に係るHCV粒子又はその一部分をワクチン抗原として含有するC型肝炎ワクチン、及び本発明に係るHCV粒子又はその一部分を抗原として用いてC型肝炎ワクチンを製造する方法も、提供する。

具体的には、作製されたHCV粒子を直接ワクチンとして使用することもできる

し、当該分野で既知の方法により弱毒化または不活化して用いることもできる。
例えば、調製したHCV粒子を、カラムクロマトグラフィー、ろ過、遠心等により
精製することにより、HCVワクチン原液を得た後、かかる原液から、弱毒生HCVワ
クチンあるいは不活化HCVワクチンを調製すればよい。尚、ウイルスの不活化は、
5 ホルマリン、 β -プロピオラクトン、グルタルジアルデヒド等の不活化剤を、例
えば、ウイルス浮遊液に添加して混合し、ウイルスと反応させることによって達
成することができる (Appaiahgari et al., Vaccine, (2004) 22(27-28),
p. 3669-3675)。

本発明のワクチンの製造には、HCVレプリコンRNAに公知の技術を用いて変異を
10 導入し病原性を原弱もしくは消失させたものを使用することも可能である。

本発明のワクチンは、溶液または懸濁液のいずれかとして、投与可能に調製さ
れる。液体中の溶解または懸濁に適した固形物の形態で調製することができる。
調製物は乳濁され、またはリポソームにカプセル化され得る。HCV粒子などの活
性免疫原性成分は、医薬上許容される、活性成分に適合した賦形剤がしばしば混
15 合される。適切な賦形剤には、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリ
セロール、エタノールなど、およびそれらの混合物がある。さらに、所望であれ
ば、ワクチンは、少量の補助剤（例えば加湿剤または乳化剤）、pH緩衝剤、お
よび/またはワクチンの効能を高めるアジュバントを含有し得る。有効であり得
るアジュバントの例は、限定されないが、以下を包含する。水酸化アルミニウム、
20 N-アセチル-L-アラニル-L-トレオニル-D-イソグルタミン (t h r-MD
P)、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニル-D-イソグルタミン (C
G P 1 1 6 3 7、n o r-MD Pと称せられる)、N-アセチル-L-アラニル-L-アラニル-D-イソグルタミ
ニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミ
トイル-sn-グリセロール-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン
25 (C G P 1 9 8 3 5 A、M T P-P Eと称せられる)、およびR I B I。R I B
Iは、バクテリアから抽出した3成分、すなわちモノホスホリルリピドA、トレ
ハロースジミコレート、および細胞壁骨格 (H P L+T D M+C W S) を2%ス
クアレン/T w e e n (登録商標) 80エマルジョン中に含有している。アジュ
バントの効能は、H C V粒子から構成されるワクチンを投与することにより生じ

るこの免疫原性HCV粒子に対する抗体の量を測定することにより、決定され得る。

本ワクチンは、通常非経口的に、例えば皮下注射または筋肉注射のような注射により投与される。他の投与経路に適した別の剤形として、坐薬、および場合により経口製剤が挙げられる。

- 5 所望により、アジュバント活性を有する1以上の化合物をHCVワクチンに加えることができる。アジュバントは、該免疫系の非特異的刺激因子である。それらは、HCVワクチンに対する宿主の免疫応答を増強する。当技術分野で公知のアジュバントの具体例としては、フロイント完全および不完全アジュバント、ビタミンE、非イオンブロッグ重合体、ムラミルジペプチド、サポニン、鉱油、植物油および
- 10 Carbopolが挙げられる。粘膜適用に特に適したアジュバントとしては、例えば、大腸菌 (E. coli) 易熱性毒素 (LT) またはコレラ (Cholera) 毒素 (CT) が挙げられる。他の適当なアジュバントとしては、例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムまたは酸化アルミニウム、油性乳剤 (例えば、Bayol (登録商標) またはMarcol 52 (登録商標) のもの)、サポニンまたはビタミンEソリュビ
- 15 リゼートが挙げられる。好ましい形態においては、本発明のワクチンはアジュバントを含む。

例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内に投与する注射剤において、本発明のHCVワクチンとともに含まれる医薬上許容される担体または希釈剤の他の具体例としては、安定化剤、炭水化物 (例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、グルコース、デキストラン)、アルブミンまたはカゼインなどの

20 タンパク質、ウシ血清または脱脂乳などのタンパク質含有物質、およびバッファー (例えば、リン酸バッファー) などが挙げられる。

坐薬に使用される従来の結合剤および担体には、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが包含され得る。坐薬は、活性成分を0.5%から

25 50%までの範囲で、好ましくは1%から20%までの範囲で含有する混合物から形成することができる。経口製剤は、通常用いられる賦形剤を含有してもよい。この賦形剤としては、例えば、製薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。

本発明のワクチンは、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、持続放出製剤、または粉剤の剤形をとることができ、10%～95%、好ましくは25%～70%の活性成分（ウイルス粒子又はその一部分）を含有する。

5 本ワクチンは、投与剤形に適した方法で、そして予防および/または治療効果があるような量で投与される。投与されるべき量は、通常1回の投与当たり抗原を0.01 μ gから100,000 μ gまでの範囲であり、これは、処置される患者、その患者の免疫系での抗体合成能、および所望の防御の程度に依存し、経口、皮下、皮内、筋肉内、静脈内経路などの投与経路にも依存する。

10 本ワクチンは、単独投与スケジュールで、または好ましくは複合投与スケジュールで与えられ得る。複合投与スケジュールでは、接種の開始時期に1～10回の個別の投与を行い、続いて免疫応答を維持するおよびまたは強化するのに必要とされる時間間隔で、例えば2回目の投与として1～4ヵ月後に、別の投与を行い得る。必要であれば、数ヶ月後に引続き投与を行い得る。投与レジメもまた、少なくとも部分的には、個々の患者の必要性により決定され、医師の判断に依存
15 する。

さらに、免疫原性HCV粒子を含有するワクチンは、他の免疫制御剤（例えば、免疫グロブリン）と共に投与してもよい。

HCV粒子ワクチンは、健常人に投与して、健常人にHCVに対する免疫応答を誘導することにより、新たに生じ得るHCV感染に対して予防的に使用することもできる。
20 更に、HCV粒子ワクチンをHCVに感染した患者に投与し、生体内にHCVに対する強い免疫反応を誘導することにより、HCVを排除する治療的ワクチンとして使用することもできる。

本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞、又はそれらの細胞において産生されるウイルス粒子を感染させたC型肝炎ウイルス感染細胞を、例えばC型肝炎ウイルスの複製、ウイルス粒子の再構築、ウイルス粒子の放出を促進又は抑制する物質（抗C型肝炎ウイルス物質）をスクリーニング
25 するための試験系として使用することもできる。具体的には、例えば、被験物質の存在下でそれらの細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコン

RNA若しくは全長HCVゲノムRNAの複製又はウイルス粒子の形成若しくは放出を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。この場合、培養物中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの検出は、上記細胞から抽出した

5 RNA中の全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNAの量、割合若しくは有無を測定することによるものであってよい。培養物（主として培養上清）中のウイルス粒子の検出は、培養上清中に含まれるHCVタンパク質の量、割合若しくは有無を検出するものであってよい。

また本培養物中のウイルス粒子を検出することにより、HCV感染患者血清から精製した免疫グロブリンが本発明によるHCVウイルス粒子の感染を阻止する能力を有するかどうかを検討することができる。この試験においては、本発明のHCVウイルス粒子により免疫したマウス、ラット、ウサギなどの血清を用いても良い。HCVの部分蛋白質、HCV遺伝子などによる免疫を利用してもよい。抗体分子以外の、感染を阻止できる他の物質についても、この試験を同様に適用

10 することができる。

本発明のHCVウイルス粒子に対して産生される本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を包含する。ポリクローナル抗体が望ましい場合、まず、選択された哺乳類（例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマなど）を、本発明のHCV粒子で免疫感作する。感作動物由来の血清を採集し、

20 既知の手法に従って処理する。HCVエピトープに対するポリクローナル抗体を含有する血清が他の抗原に対する抗体を含有する場合には、このポリクローナル抗体をイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製すればよい。ポリクローナル抗血清を産生させる方法およびそれを処理する方法は当該分野で既知である。ポリクローナル抗体は、既にHCVに感染した哺乳類から単離してもよい。

HCVエピトープに対するモノクローナル抗体もまた、当業者により容易に製造され得る。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを製造する一般的な方法は、周知である。例えば、Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc.)に記載された方法を用いることができる。

25

モノクローナル抗体産生細胞株は、細胞融合により生成してもよく、また、腫

瘍遺伝子DNAによるBリンパ球の直接形質転換またはEpstein-Barrウイルスでの形質移入のような他の方法によっても生成してもよい。

これらの方法によって得られたモノクローナル抗体や、ポリクローナル抗体は、HCVの診断や治療、予防に有用である。

- 5 本発明のHCV粒子を用いて作製された抗体は、医薬上許容される、溶解剤、添加剤、安定化剤、バッファーなどともに投与される。投与経路は、いずれの投与経路でも良いが、好ましくは、皮下、皮内、筋肉内投与であり、より好ましくは、静脈内投与が好ましい。

- 10 本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞において產生されたHCV粒子とHCV感受性細胞とを、HCVの細胞への結合を促進又は抑制する物質をスクリーニングするための試験系として使用することもできる。具体的には例えば、被験物質の存在下で、本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞において產生されたHCV粒子とともにHCV感受性細胞を培養し、得られる培養物中の全長HCVレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出し、その被験物質がレプリコン
- 15 RNAの複製又はウイルス粒子の形成を促進又は抑制するかどうかを判定することにより、C型肝炎ウイルスの増殖を促進又は抑制する物質をスクリーニングすることができる。

- 20 このような全長HCVレプリコンRNA若しくは全長HCVゲノムRNA又はウイルス粒子の検出は、上述の手法又は後述の実施例に従って行うことができる。上記試験系は、C型肝炎ウイルス感染の予防剤、治療剤若しくは診断剤の製造又は評価のためにも使用することができる。

具体的には、本発明の上記試験系の利用例としては以下が挙げられる。

(1) HCVの増殖及び感染を抑制する物質の探索

- 25 HCVの増殖及び感染を抑制する物質としては、例えば、直接的若しくは間接的にHCVの増殖及び感染に影響を及ぼす有機化合物、あるいはHCVゲノム若しくはその相補鎖の標的配列にハイブリダイズすることによりHCVの増殖若しくはHCVタンパク質の翻訳に直接的又は間接的に影響を及ぼすアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

(2) 細胞培養中で抗ウイルス作用を有する各種物質の評価

前記各種物質としては、合理的ドラッグデザイン又はハイスループットスクリーニングを用いて得られた物質（例えば単離精製された酵素）等が挙げられる。

(3) HCVに感染した患者の治療のための、新規攻撃標的の同定

例えばHCVウイルス増殖のために重要な役割を果たす宿主細胞性タンパク質を同定するために、本発明に係る全長HCVレプリコンRNA複製細胞又は全長HCVゲノムRNA複製細胞を使用することができる。

(4) HCVウイルスの薬剤等に対する耐性獲得能の評価及び該耐性に関わる変異の同定

(5) C型肝炎ウイルス感染の診断薬又は治療薬の開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質の製造

(6) C型肝炎ウイルス感染のワクチンの開発、製造及び評価のために使用可能な抗原としてのウイルスタンパク質及び弱毒化HCVの製造

(7) C型肝炎ウイルス感染の診断又は治療用のポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の製造。

15

本発明を、以下の実施例及び図面に基づいてさらに具体的に説明する。但し本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] 全長HCVゲノムRNA由来の全長HCVレプリコンRNAの作製

(A) 発現ベクターの構築

20 劇症肝炎の患者から分離したC型肝炎ウイルスであるJFH-1株（遺伝子型2a）のゲノム全長cDNAを含むDNA（JFH-1クローン）を、pUC19プラスミド中でT7 RNAプロモーター配列の下流に挿入したプラスミドDNAを作製した。

具体的には、JFH-1株のウイルスRNAを増幅したRT-PCR断片をpGEM-T EASY vector（Promega）にクローニングしてpGEM1-258、pGEM44-486、pGEM317-849、
25 pGEM617-1323、pGEM1141-2367、pGEM2285-3509、pGEM3471-4665、pGEM4547-5970、pGEM5883-7003、pGEM6950-8035、pGEM7984-8892、pGEM8680-9283、pGEM9231-9634及びpGEM9594-9678の各プラスミドDNAを得た（非特許文献6を参照）。各プラスミドに含まれるウイルスゲノムRNA由来のcDNAをPCR法および制限酵素を用いてつなぎ合わせて、全長のウイルスゲノムcDNAをクローニングした。全長のウイ

ルスゲノムの上流にT7R RNAプロモーター配列を挿入した。このようにして構築されたプラスミドDNAを、以下、pJFH1と称する（図1上段）。なお、上記JFH-1クローンの作製については、特許文献1及び非特許文献3に記載されている。またJFH-1クローンの全長cDNAの塩基配列は、国際DNAデータベース（DDBJ/EMBL/GenBank）のアクセッション番号：AB047639に登録されている。

次に、プラスミドDNAであるpJFH1の5'非翻訳領域とcore領域の間に、EMCV-IRES（脳心筋炎ウイルスの内部リボゾーム結合部位）及びネオマイシン耐性遺伝子（neo；ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子とも称する）を挿入して、プラスミドDNAであるpFGREP-JFH1を構築した（図1の下段）。この構築手順は、既報（非特許文献4）に従った。また、pJFH1及びpFGREP-JFH1中のNS5B領域について、該領域にコードされるRNAポリメラーゼの活性中心に相当するアミノ酸モチーフGDDをGNDに変異させる突然変異を導入して、突然変異プラスミドクローンpJFH1/GND、及びpFGREP-JFH1/GNDも作製した。突然変異クローンpJFH1/GND及びpFGREP-JFH1/GNDは、それにコードされるNS5Bタンパク質の活性部位のアミノ酸配列が変異しているため、レプリコンRNAを複製するのに必要な活性NS5Bタンパク質を発現することができない。

さらに、レポーター遺伝子導入発現ベクターとして、pFGREP-JFH1の415から420番のMluIサイトと2075から2082番のPmeIサイトの間にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、pFGREP-JFH1のネオマイシン耐性遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子に置換したpFGREP-JFH1/Lucを作製した。また、pFGREP-JFH1/Lucの10933番をGからAに変異させ、NS5bのRNAポリメラーゼの活性中心のGDDモチーフをGNDに変えた変異体pFGREP-JFH1/Luc/GNDを作製した。

pFGREP-JFH1の415から420番のMluIサイトと1142から1149番のPmeIサイトの間に緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入し、pFGREP-JFH1のネオマイシン耐性遺伝子を緑色蛍光タンパク質遺伝子に置換したpFGREP-JFH1/EGFPを作製した。さらに、pFGREP-JFH1/EGFPの10000番をGからAに変異させ、NS5bのRNAポリメラーゼの活性中心のGDDモチーフをGNDに変えた変異体pFGREP-JFH1/EGFP/GNDを作製した。

pFGREP-JFH1の415から420番のMluIサイトと1982から1989番のPmeIサイトの間に分泌型胎盤アルカリ性フォスファターゼ遺伝子を導入し、pFGREP-JFH1のネオ

マイシン耐性遺伝子を分泌型胎盤アルカリ性フォスファターゼ遺伝子に置換した pFGREP-JFH1/SEAP を作製した。また、pFGREP-JFH1/SEAP の 10840 番を G から A に変異させ、NS5b の RNA ポリメラーゼの活性中心の GDD モチーフを GND に変えた変異体 pFGREP-JFH1/SEAP/GND を作製した。

5

(B) 全長 HCV ゲノム RNA と全長 HCV レプリコン RNA の作製

全長 HCV ゲノム RNA 合成及び全長 HCV レプリコン RNA 合成に用いる鋳型 DNA を作製するために、上記のとおり構築した発現ベクター pJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GND を、それぞれ制限酵素 XbaI で切断した。次いで、これらの XbaI 切断断片のそれぞれについて、10~20 μ g を 50 μ l の反応液中に含有させ、Mung Bean Nuclease 20 U を用いて 30°C で 30 分間インキュベートすることにより、さらに処理した。Mung Bean Nuclease は、二本鎖 DNA 中の一本鎖部分を選択的に分解する反応を触媒する酵素である。通常、上記 XbaI 切断断片をそのまま鋳型として用いて RNA 合成を行うと、XbaI の認識配列の一部である CUGA の 4 塩基が 3' 末端に余分に付加されたレプリコン RNA が合成されてしまう。そこで本実施例では、XbaI 切断断片を Mung Bean Nuclease で処理することにより、XbaI 切断断片から CUGA の 4 塩基を除去した。この後、XbaI 切断断片を含む Mung Bean Nuclease 処理後の溶液について、通常法に従ったタンパク質除去処理により、CUGA の 4 塩基が除去された XbaI 切断断片を精製して、これを鋳型 DNA とした。

次に、この鋳型 DNA から、T7 RNA ポリメラーゼを用いて RNA を *in vitro* 合成した。この RNA 合成には Ambion 社の MEGAscript を用いた。鋳型 DNA を 0.5~1.0 マイクログラム含む反応液 20 μ l を製造業者の使用説明書に従って反応させた。

RNA 合成終了後、反応溶液に DNase (2 U) を添加して 37°C で 15 分間反応させた後、さらに酸性フェノールによる RNA 抽出を行って、鋳型 DNA を除去した。このようにして pJFH1、pJFH1/GND、pFGREP-JFH1、pFGREP-JFH1/GND に由来する上述の鋳型 DNA から合成した RNA を、それぞれ rJFH1、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1、rFGREP-JFH1/GND と命名した。これらの RNA の塩基配列を、rJFH1、rFGREP-JFH1 については配列番号 1 2 及び 1 3、rJFH1/GND、rFGREP-JFH1/GND については配列番号 1 4 及び 1 5 にそれぞれ示す。rJFH1 は、JFH-1 株の全長 HCV ゲノムと同じ配列構造を

もつ、本発明の全長HCVゲノムRNAの一例である。rFGREP-JFH1は、本発明における全長HCVレプリコンRNAの一例である。

続いて、上述の通り作製した発現ベクター pFGREP-JFH1/Luc、pFGREP-JFH1/Luc/GND、pFGREP-JFH1/EGFP、pFGREP-JFH1/EGFP/GND、pFGREP-JFH1/SEAP、
5 pFGREP-JFH1/SEAP/GNDをそれぞれ鋳型として用いて、HCVレプリコンRNAである rFGR-JFH1/Luc（配列番号 2 1）、rFGR-JFH1/Luc/GND（配列番号 2 2）、rFGR-JFH1/EGFP（配列番号 2 3）、rFGR-JFH1/EGFP/GND（配列番号 2 4）、rFGR-JFH1/SEAP（配列番号 2 5）、rFGR-JFH1/SEAP/GND（配列番号 2 6）を上記と同様の方法で製造した。

10

[実施例 2] 細胞内における全長HCVゲノムRNA複製細胞とウイルス粒子産生

(C) 細胞内における全長HCVゲノムRNAの複製とウイルス粒子の産生

上記の通り合成した全長HCVゲノムRNA（rJFH1、rJFH1/GND）のそれぞれを、様々な量で、Huh7細胞から抽出したトータル細胞性RNAと混合して、RNA総量が 1
15 0 μ gとなるように調製した。次いでその混合RNAをエレクトロポレーション法によりHuh7細胞に導入した。エレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間及び72時間培養した後に、細胞を回収して、細胞からRNAを抽出して、ノーザンブロットで解析した。ノーザンブロット解析は、Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2nd edition,
20 J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis著、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)の記載に従って行った。具体的には、培養後の細胞から抽出したRNAを変性アガロース電気泳動に供し、泳動終了後にRNAをポジティブチャージナイロン膜に転写した。pJFH1から作製した³²PラベルしたDNAまたはRNAプローブを、前記のとおり膜に転写したRNAに対しハイブリダイゼーションさせ、次いでその
25 膜を洗浄し、それをフィルムに感光させることにより、JFH-1クローンの全長HCVゲノムRNAに特異的なRNAバンドを検出した。

図2に示すように、rJFH1/GNDをトランスフェクションした場合、トランスフェクション4時間後において、導入したRNAバンドは弱いシグナルとして確認できたが、時間の経過とともにシグナルは減弱し、24時間後にはほとんどバンド

のシグナルが確認できなかった。一方、rJFH1をトランスフェクションした場合、トランスフェクションの4時間後～1.2時間後には、導入したRNAバンドのシグナルの強さはrJFH1/GNDを導入した場合と同様にいったん減弱したが、24時間以降にははっきりとしたRNAバンドのシグナルが確認できた。確認されたシグナルはHCVゲノムRNAに特異的であった。つまり導入した全長HCVゲノムRNAの一部が複製増殖したものと考えられた。RNA複製酵素であるNS5Bの活性モチーフを変異させたrJFH1/GNDでは複製はみられず、NS5Bの活性が全長HCVゲノムRNAの複製に重要であることが示された。一方、これまでに分離されたH77株（非特許文献7）、J6株（非特許文献8）や本発明者らが慢性肝炎から分離したJCH1株（非特許文献6）などのC型肝炎ウイルス株に由来する全長HCVゲノムRNAについても同様の実験をおこなったが、これらの株では全長HCVゲノムRNAの複製は全く確認できなかった。

(D) トランスフェクション細胞培養液中のHCVウイルス粒子の検出

上記に従ってエレクトロポレーション処理を行ったHuh7細胞を培養ディッシュに播種し、12時間、24時間、48時間、及び72時間培養した後、培養上清中のHCVコアタンパク質を測定した。測定はオーソHCV抗原IRMAテストによって行った（非特許文献9）。図3に示す通り、rJFH1をトランスフェクションして48時間後及び72時間後の培養上清中にコアタンパク質が検出された。このコアタンパク質がウイルス粒子として分泌されているかどうかを確認するため、rJFH1をトランスフェクションした72時間後の培養液をシヨ糖密度勾配により分画した。60%（重量/重量）シヨ糖溶液（50mM Tris pH7.5/0.1M NaCl/1mM EDTAに溶解）2ml、50%シヨ糖溶液1ml、40%シヨ糖溶液1ml、30%シヨ糖溶液1ml、20%シヨ糖溶液1ml、10%シヨ糖溶液1mlを遠心チューブに重層し、さらにその上にサンプルの培養上清を4ml重層した。これをベックマンローターS W41Tiで400,000RPM、4℃、16時間遠心した。遠心終了後遠心チューブの底から0.5mlずつ分画回収した。各分画の密度、HCVコア蛋白濃度、全長HCVゲノムRNA量を定量した。全長HCVゲノムRNAの定量的RT-PCRによる検出は、Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T, Abe A, Inoue K, Tsukiyama-Kohara K, Kawaguchi R, Tanaka S,

Kohara M. Real-Time detection system for quantification of Hepatitis C virus genome. Gastroenterology 116: 636-642 (1999)に従い、全長HCVゲノムRNAの5' 非翻訳領域のRNAを検出することによって行った。具体的には、細胞から抽出したRNAに含まれる全長HCVゲノムRNAを、合成プライマー、R6-130-S17:
5 5' -CGGGAGAGCCATAGTGG-3' (配列番号 16)、R6-290-R19: 5' -
AGTACCACAAGGCCTTTCG-3' (配列番号 17)、TaqMan Probe: R6-148-S21FT,
5' -CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3' (配列番号 18) とEZ rTth RNA PCR kitを用いてPCR増幅し、次いでABI Prism 7700 sequence detector systemにより検出した。

図4に示すように11番のフラクションでコアタンパク質と全長HCVゲノムRNA
10 のピークが一致した。このフラクションの密度は約1.18mg/mlであり、これまで報告されているコアタンパク質と核酸の結合物よりも軽い比重であった。さらに培養上清を0.25% NP40で処理した後に同様の分画を行うと、コアタンパク質と全長HCVゲノムRNAのピークは比重約1.28mg/mlへとシフトした。つまり、NP40処理により、脂質を含む比重の軽い表面膜がウイルス粒子から剥離して、核酸とコア
15 タンパク質のみのコア粒子となった結果、比重が重くなったと考えられた。以上の結果から、rJFH1をHuh7細胞へトランスフェクションすることにより細胞内で全長HCVゲノムRNAが複製されたこと、さらにウイルス粒子が形成され、培養上清中に分泌されたことが明らかになった。

20 [実施例3]

(E) 全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製及び細胞クローンの樹立

実施例1で作製したrFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDを、実施例2と同様にしてHuh7細胞へトランスフェクションして全長HCVレプリコンRNA複製細胞の作製を行い、さらに全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンの樹立を試みた。

25 まず、rFGREP-JFH1及びrFGREP-JFH1/GNDのそれぞれをHuh7細胞へトランスフェクションした後、培養ディッシュにその細胞を播種した。16時間から24時間培養した後にG418を様々な濃度で添加した。週に2回培養液を交換しながら培養を継続した。21日間培養した後、クリスタルバイオレットで生存細胞を染色した。染色されるコロニー数を計測し、トランスフェクションしたRNA重量あたり

に得られたコロニー数を計算した。また、一部の培養ディッシュでは生存細胞のコロニーをクローン化して培養を継続した。クローン化された細胞からRNA、ゲノムDNA、タンパク質をそれぞれ抽出した後、全長HCVレプリコンRNAの検出、ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無、HCVタンパク質の発現を
5 検討した。これらの結果の詳細は下記に示す。

(F) コロニー形成能

上記のトランスフェクションの結果、トランスフェクションしたレプリコンRNA 1 μ g当たりのコロニー形成能は、rFGREP-JFH1をトランスフェクションした
10 Huh7細胞では、G418濃度が1.0 mg/mlの場合、368 CFU (Colony Forming Unit; コロニー形成単位)/ μ g \cdot RNAであった (図5の左側)。これに対して、rFGREP-JFH1/GNDをトランスフェクションしたHuh7細胞では、コロニー形成が認められなかった (図5の右側)。このことは、rFGREP-JFH1レプリコンRNAをトランスフェクションしたHuh7細胞のコロニー形成能は、rFGREP-JFH1から発現されるNS5B
15 (RNAポリメラーゼ) の活性に依存することを示した。つまり、コロニーを形成した細胞では、rFGREP-JFH1から発現されるNS5BのはたらきによりrFGREP-JFH1レプリコンRNAが自律複製することによって、ネオマイシン耐性遺伝子が持続的に発現されG418耐性が維持される結果、細胞増殖が可能になったものと考えられた。

20 (G) 樹立した細胞クローンにおける全長HCVレプリコンRNAの検出

上記(E)に従ってrFGREP-JFH1のHuh7細胞へのトランスフェクションにより樹立した全長HCVレプリコンRNA複製細胞クローンから、酸性フェノール抽出法によりトータルRNAを抽出した。次いでこのトータルRNAをノーザンブロット法により解析した。プローブとしてはpFGREP-JFH1特異的プローブを用いた。対照として
25 は、トランスフェクションを行っていないHuh7細胞から同様に抽出したトータルRNA (図6中、「Huh7」として示す)、Huh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の7乗コピー加えたサンプル (図6中、「 10^7 」として示す)、及びHuh7細胞から抽出したトータルRNAに試験管内で合成したレプリコンRNAを10の8乗コピー加えたサンプル (図6中、「 10^8 」として示

す)を用いた。図6中、1～4は細胞クローンの番号である。

この結果、rFGREP-JFH1と同程度の大きさのRNAがpFGREP-JFH1特異的プローブにより検出された(図6)。これにより、トランスフェクションしたrFGREP-JFH1レプリコンRNAが細胞クローン内で複製増殖していることが確認された。また細胞クローン間で、レプリコンRNAの量に差があることが示された。図6中、例えば、クローン2はレプリコンRNAの量が他のクローンに比べて少なかった。

(H) ネオマイシン耐性遺伝子のゲノムDNAへの組み込みの有無の確認

(E)に従って得られた細胞クローン1～8(図7中ではFGR-JFH1/2-1～FGR-JFH1/2-8と表記)について、その細胞クローンのG418に対する耐性がネオマイシン耐性遺伝子の宿主細胞ゲノムへの組み込みによるものでないことを確認するために、ネオマイシン耐性遺伝子特異的プライマー(センスプライマー、NEO-S3: 5'-AACAAGATGGATTGCACGCA-3'(配列番号19)、アンチセンスプライマー、NEO-R: 5'-CGTCAAGAAGGCGATAGAAG-3'(配列番号20))を用いて、細胞クローンから抽出した宿主細胞のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅を行った。この結果、図7に示すとおり、ネオマイシン耐性遺伝子の増幅が示された陽性クローンは認められなかった。

この(H)の結果から、本発明の全長HCVレプリコンRNAをトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長HCVレプリコンRNAが複製されていることが確認された。

(I) HCVタンパク質の検出

rFGREP-JFH1をトランスフェクションし樹立した細胞クローンから常法によりタンパク質を抽出して、SDS-PAGE及びウェスタンブロット法による解析を行った。調べた細胞クローンは、上記(G)で用いたものと同じである。合成した全長HCVゲノムRNAをHuh7細胞に一過性にトランスフェクションして得られた細胞抽出液を陽性対照とした(図8、図9及び図10中、JFH-1として示す)。HCVのサブジェノミックRNAレプリコン(SGR-JFH1)をトランスフェクションして得られたクローン細胞抽出液をcoreタンパク質の陰性対照として、及びNS3、NS5aタンパ

ク質の陽性対照として用いた（図 8、図 9 及び図 10 中、SGR-JFH1 として示す）。
トランスフェクションしていない Huh7 細胞抽出液は全ての陰性対照として用いた
（図 8、図 9 及び図 10 中、Huh7 として示す）。それぞれの細胞クローンから抽出したタンパク質試料を PVDF 膜（Immobilon-P, Millipore 社製）にブロッティングし、抗 core 特異的抗体及び抗 NS3 特異的抗体（Dr. Moradpour より分与されたもの；Wolk B, et al, J. Virology. 2000; 74: 2293-2304）を用いて、全長 HCV レプリコン RNA にコードされている core タンパク質及び NS3 タンパク質を検出した。図 8 及び図 9 に示される通り、rFGREP-JFH1 をトランスフェクションし樹立した細胞クローン 1～4 では、それぞれのタンパク質について陽性対照と同じ
5 大きさのタンパク質が検出された。トランスフェクションしていない Huh7 細胞では core タンパク質、及び NS3 タンパク質も検出されなかったため、細胞クローン 1～4 では、トランスフェクションされた全長 HCV レプリコン RNA が自律複製し、さらに core タンパク質や NS3 タンパク質が発現されていることが確認された。

なお、C 型肝炎患者の血清を抗体として用いることにより、上記で NS3 タンパク質の発現が確認された各細胞クローンについて、全長 HCV レプリコン RNA からの NS5A タンパク質の発現も同様に確認した（図 10）。

以上の (H) 及び (I) の結果から、全長 HCV レプリコン RNA をトランスフェクションし樹立した細胞クローンでは、全長 HCV レプリコン RNA が複製され、さらにウイルスタンパク質が発現されていることが確認された。

(J) 全長 HCV レプリコン RNA 複製細胞におけるウイルス粒子産生

上記 (E) に従って rFGREP-JFH1 を Huh7 細胞へトランスフェクションし、樹立した全長 HCV レプリコン RNA 複製細胞クローン 2 及び 3（FGR-JFH1/2-3）の培養上清を回収して、上記 (D) と同様の方法で、培養上清中の HCV ウイルス粒子を測定した。この結果を図 11 に示す。図 11 中、網掛けの円は各フラクション（画分）の比重（g/ml）を示す。また黒塗りの円は、core タンパク質の量（fmol/L）を示す。白抜きの円は、全長 HCV レプリコン RNA の力価（×0.1 コピー/mL）を示す。

図 11 に示すように、比重が約 1.18～1.20 mg/ml となるフラクションで、core タンパク質と全長 HCV レプリコン RNA のピークは一致していた。またそれよりも軽

い分画にも小さなピークを認めた。以上の結果から、rFGREP-JFH11をトランスフェクションしたHuh7細胞中では、全長HCVレプリコンRNAが複製されたこと、及びウイルス粒子が形成されて培養上清中に分泌されたことが示された。

5 [実施例 4]

(K) 培養上清中のウイルス粒子の感染実験

(H) で用いた細胞クローン 1 ~ 8 (FGR-JFH1/2-1、FGR-JFH1/2-2、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-4、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6、FGR-JFH1/2-7、FGR-JFH1/2-8) のそれぞれの培養上清をHuh7細胞に添加して、培養上清中のウイルス
10 粒子をHuh7細胞に感染させた。感染翌日に感染させたHuh7細胞の培養液にG418を0.3mg/ml添加し、さらに21日間培養した。培養終了後に細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色したところ、FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5、FGR-JFH1/2-6の培養上清を用いて感染させた細胞についてコロニー形成が観察された。一方、対照に用いたサブジェノミックレプリコン細胞SGR-JFH1/4-1 (非特許文献
15 6 記載) の培養上清を用いて感染させた細胞ではコロニー形成はみられなかった。図12に、FGR-JFH1/2-3とSGR-JFH1/4-1の培養上清4mlまたは8mlをHuh7細胞に添加し、21日間培養した後に染色した培養ディッシュの写真を示す。FGR-JFH1/2-3の培養上清4mlを添加した細胞を播種したディッシュには3コロニー、FGR-JFH1/2-3の培養上清8mlを添加した細胞を播種したディッシュには9コロニー
20 の形成を確認した。しかし、SGR-JFH1/4-1の培養上清を添加した細胞を播種したディッシュではコロニー形成はみられなかった。

FGR-JFH1/2-3、FGR-JFH1/2-5の培養上清を用いてC型肝炎ウイルスに感染させ、形成されたコロニーを、次いでクローン化した。FGR-JFH1/2-3の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-
25 13の3クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5の培養上清を用いた培養ディッシュから、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の2クローンを樹立した。

FGR-JFH1/C2-3-11、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-3-13、FGR-JFH1/C2-5-11、FGR-JFH1/C2-5-12の各細胞クローンの培養上清を用いて再度Huh7細胞を感染させると、FGR-JFH1/C2-3-12、FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いた培養ディッシュ

ではコロニーの形成が観察された。FGR-JFH1/C2-3-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-3-12-1, FGR-JFH1/C2-3-12-2の2クローンを樹立した。FGR-JFH1/C2-5-12の培養上清を用いて感染させた細胞から、さらにFGR-JFH1/C2-5-12-1、FGR-JFH1/C2-5-12-2の2クローンを樹立した。

- 5 以上の通り全長HCVレプリコンRNA複製細胞の培養上清を用いて感染させ、その感染細胞より樹立したこれらの細胞クローンから、RNA、タンパク質、ゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAを鋳型としたPCRでネオマイシン耐性遺伝子の組み込みの有無を検討したところ、いずれも陰性であった。また、RNAを鋳型とする定量的PCR法により、細胞内で複製している全長HCVレプリコンRNAを検出することができた。さらに培養上清中にcoreタンパク質を検出することができた。この結果は、
10 本発明の全長HCVレプリコンRNA複製細胞から産生された全長HCVレプリコンRNAを含むウイルス粒子が、新たな細胞に感染することができることを示している。

産業上の利用可能性

- 15 本発明の方法により、HCVウイルス粒子を細胞培養系で作製することができる。本発明のレプリコンRNAを用いれば、細胞培養系においてHCVの全長ゲノムRNAを含有するRNAを効率よく製造することができる。また本発明に係る全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞を用いれば、全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを複製し、本発明のHCVウイルス粒子を細胞培養系で持
20 続的に産生させることができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAを導入した細胞は、HCVの複製過程、ウイルス粒子形成過程、ウイルス粒子の細胞外放出過程に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することもできる。本発明の全長HCVレプリコンRNA及び全長HCVゲノムRNA並びにウイルス粒子は、外来遺伝子のウイルスベクターとしても有用である。本発明のウイルス粒子又はその一部分はまた、C型肝炎ウイルスに対するワ
25 クチン抗原としてワクチンに含有させることができる。さらに、本発明のウイルス粒子と他の細胞とを一緒に培養する系を、ウイルス粒子の細胞への感染に影響を及ぼす各種物質をスクリーニングするための試験系として利用することができる。本発明の全長HCVレプリコンRNA又は全長HCVゲノムRNAはまた、HCVの全長ゲ

ノム配列を容易に複製することができる鋳型としても有用である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願の全体を参照として本明細書に組み入れるものとする。

5 配列表フリーテキスト

配列番号 1 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAの5' 非翻訳領域を示す。

配列番号 2 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのcoreタンパク質コード配列を示す。

配列番号 3 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのE1タンパク質コード配列を示す。

配列番号 4 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのE2タンパク質コード配列を示す。

配列番号 5 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS2タンパク質コード配列を示す。

配列番号 6 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS3タンパク質コード配列を示す。

配列番号 7 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS4Aタンパク質コード配列を示す。

配列番号 8 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS4Bタンパク質コード配列を示す。

配列番号 9 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS5Aタンパク質コード配列を示す。

配列番号 10 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAのNS5Bタンパク質コード配列を示す。

配列番号 11 の配列は、JFH-1 クローン由来のHCVゲノムRNAの3' 非翻訳領域を示す。

配列番号 12 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長HCVゲノムRNAを示す。

配列番号 13 の配列は、JFH-1 クローン由来の全長HCVゲノムRNAを含むレプリコンRNAを示す。

配列番号 1 4 の配列は、アミノ酸モチーフGDDをGNDに変異させた、JFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNAを示す。

配列番号 1 5 の配列は、アミノ酸モチーフGDDをGNDに変異させた、JFH-1クローン由来の全長HCVゲノムRNAを含むレプリコンRNAを示す。

5 配列番号 1 6 ～ 2 0 の配列は、プライマーを示す。

配列願号 2 1 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/Luc由来のレプリコンRNAを示す。

配列願号 2 2 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/Luc/GND由来のレプリコンRNAを示す。

10 配列願号 2 3 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/EGFP由来のレプリコンRNAを示す。

配列願号 2 4 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/EGFP/GND由来のレプリコンRNAを示す。

配列願号 2 5 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/SEAP由来のレプリコンRNAを示す。

15 配列願号 2 6 の配列は、発現ベクターpFGREP-JFH1/SEAP/GND由来のレプリコンRNAを示す。

請求の範囲

- 1 . 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAの、5' 非翻訳領域、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2
5 タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3' 非翻訳領域と、少なくとも1つの選択マーカ－遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子と、少なくとも1つのIRES配列と、を含む塩基配列からなる、レプリコンRNA。
- 10 2 . 前記塩基配列が、前記の5' 非翻訳領域、少なくとも1つの選択マーカ－遺伝子及び／又は少なくとも1つのリポーター遺伝子、少なくとも1つのIRES配列、coreタンパク質コード配列、E1タンパク質コード配列、E2タンパク質コード配列、NS2タンパク質コード配列、NS3タンパク質コード配列、NS4Aタンパク質コード配列、NS4Bタンパク質コード配列、NS5Aタンパク質コード配列、NS5Bタンパク質コード配列、及び3' 非翻訳領域を、5' から3' 方向へこの順番で含む、請求項
15 1 記載のレプリコンRNA。
- 3 . 遺伝子型2aのC型肝炎ウイルスのゲノムRNAが、配列番号 1 2 に示す塩基配列からなるRNAである、請求項 1 又は 2 記載のレプリコンRNA。
- 20 4 . 5' 非翻訳領域が配列番号 1 に示す塩基配列からなり、coreタンパク質コード配列が配列番号 2 に示す塩基配列からなり、E1タンパク質コード配列が配列番号 3 に示す塩基配列からなり、E2タンパク質コード配列が配列番号 4 に示す塩基配列からなり、NS2タンパク質コード配列が配列番号 5 に示す塩基配列からなり、NS3タンパク質コード配列が配列番号 6 に示す塩基配列からなり、NS4Aタンパク質コード配列が配列番号 7 に示す塩基配列からなり、NS4Bタンパク質コード配列が配列番号 8 に示す塩基配列からなり、NS5Aタンパク質コード配列が配列番号 9 に示す塩基配列からなり、NS5Bタンパク質コード配列が配列番号 1 0 に示す塩基配列からなり、3' 非翻訳領域が配列番号 1 1 に示す塩基配列からなる、請求
25 項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNA。
- 5 . 以下の(a)又は(b)のRNAからなるレプリコンRNA。

(a) 配列番号 1 3 に示す塩基配列からなるRNA。

(b) 配列番号 1 3 に示す塩基配列において 1 ～ 1 0 0 個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列からなるRNAであって、自律複製能及びウイルス粒子産生能を有するRNA。

5 6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項記載のレプリコンRNAを細胞に導入することを含む、該レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

7. 細胞が増殖性細胞である、請求項 6 記載の方法。

8. 細胞が真核細胞である、請求項 6 又は 7 記載の方法。

10 9. 真核細胞がヒト肝由来細胞、ヒト子宮頸由来細胞、又はヒト胎児腎由来細胞である、請求項 8 記載の方法。

10. 真核細胞がHuh7細胞、HepG2細胞、IMY-N9細胞、HeLa細胞、又は293細胞である、請求項 8 記載の方法。

15 11. 請求項 6 ～ 1 0 のいずれか 1 項記載の方法により製造される、レプリコンRNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞。

12. 請求項 1 1 記載の細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

13. 請求項 1 2 記載の方法により製造される、C型肝炎ウイルス粒子。

20 14. 請求項 1 1 記載の細胞を培養し、培養物中のウイルス粒子を他の細胞に感染させることを含む、C型肝炎ウイルス感染細胞を製造する方法。

15. 請求項 1 4 記載の方法によって製造される、C型肝炎ウイルス感染細胞。

16. 被験物質の存在下で、下記(a)～(c)：

(a) 請求項 1 1 記載の細胞

25 (b) 請求項 1 5 記載のC型肝炎ウイルス感染細胞、並びに

(c) 請求項 1 3 記載のC型肝炎ウイルス粒子及びC型肝炎ウイルス感受性細胞、
のうちの少なくとも1つを培養し、得られる培養物中のレプリコンRNA又はウイルス粒子を検出することを含む、抗C型肝炎ウイルス物質をスクリーニングする方法。

17. 請求項13記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を含有する、C型肝炎ワクチン。

18. 請求項13記載のC型肝炎ウイルス粒子又はその一部分を抗原として使用して、C型肝炎ワクチンを製造する方法。

5 19. 請求項1～5のいずれか1項記載のレプリコンRNAを使用して、遺伝子治療のための肝細胞指向性ウイルスベクターを製造する方法。

20. 請求項18に記載の方法により製造される、肝細胞指向性ウイルスベクター。

10 21. 外来遺伝子をコードするRNAを請求項1～5のいずれか1項記載のレプリコンRNA中に挿入し、それを細胞中に導入することを含む、該細胞内で外来遺伝子を複製及び／又は発現させる方法。

22. 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入することを含む、該RNAを複製しかつウイルス粒子を産生する細胞を製造する方法。

15 23. 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、C型肝炎ウイルス粒子の製造方法。

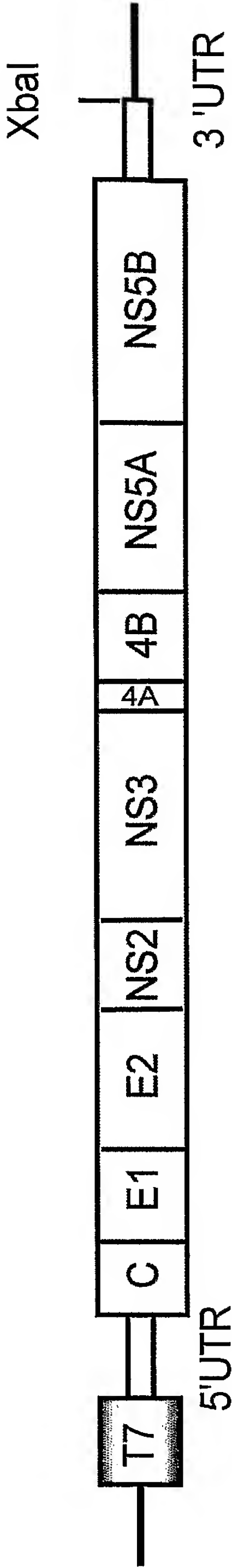
24. 細胞が増殖性細胞である、請求項21又は22記載の方法。

20 25. 配列番号12に示す塩基配列からなるRNAに外来遺伝子をコードするRNAを挿入し、それを細胞に導入し、その細胞を培養してウイルス粒子を産生させることを含む、外来遺伝子を含有するウイルスベクターを製造する方法。

26. 請求項13記載のC型肝炎ウイルス粒子に対する抗体。

図 1

pJFH1



pFGREP-JFH1

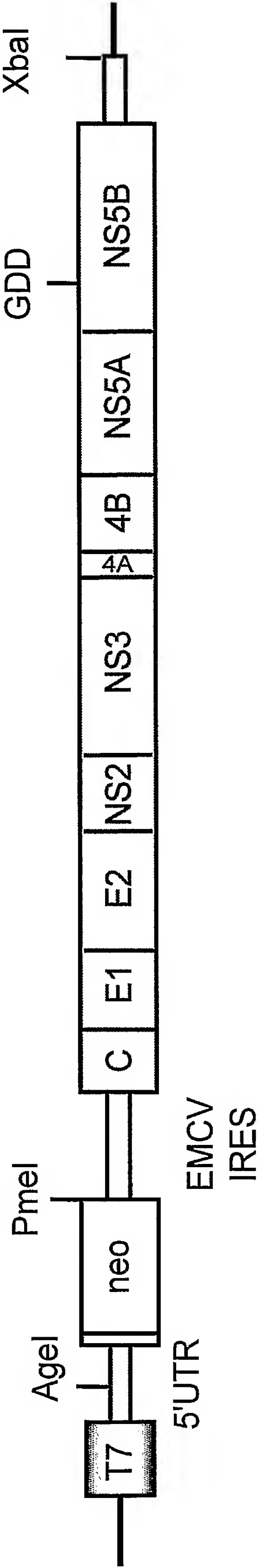


図 2

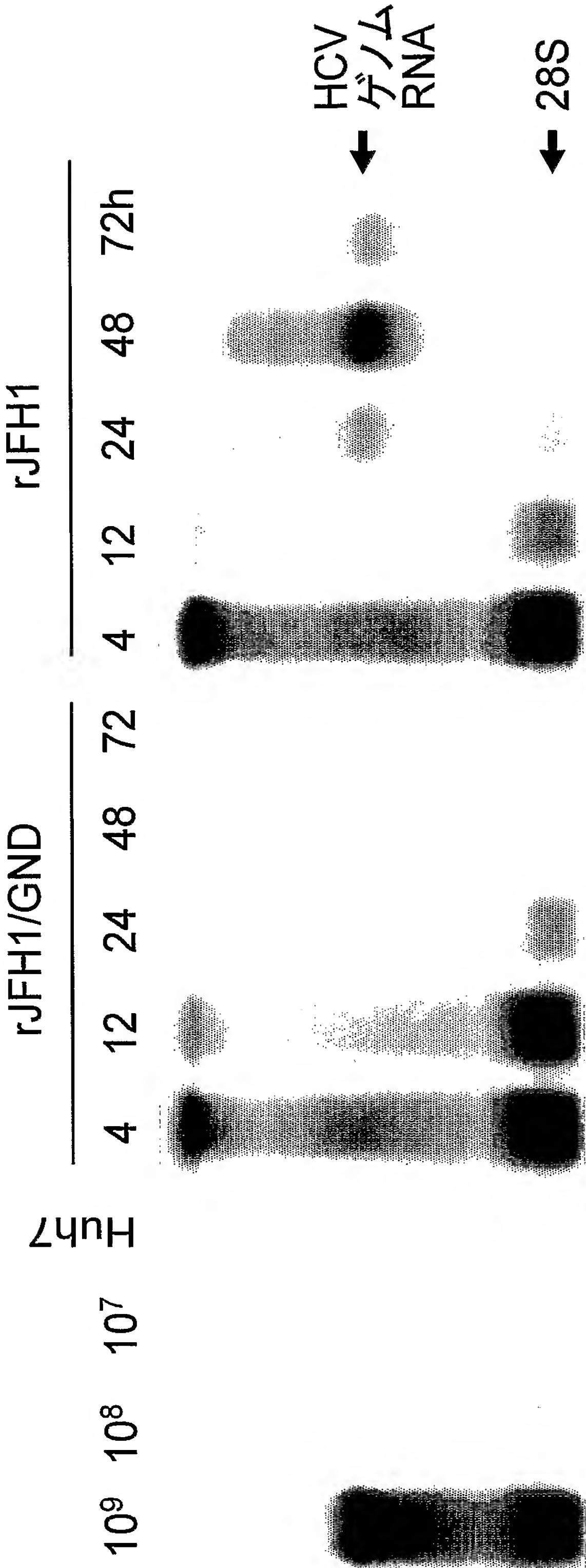


図3

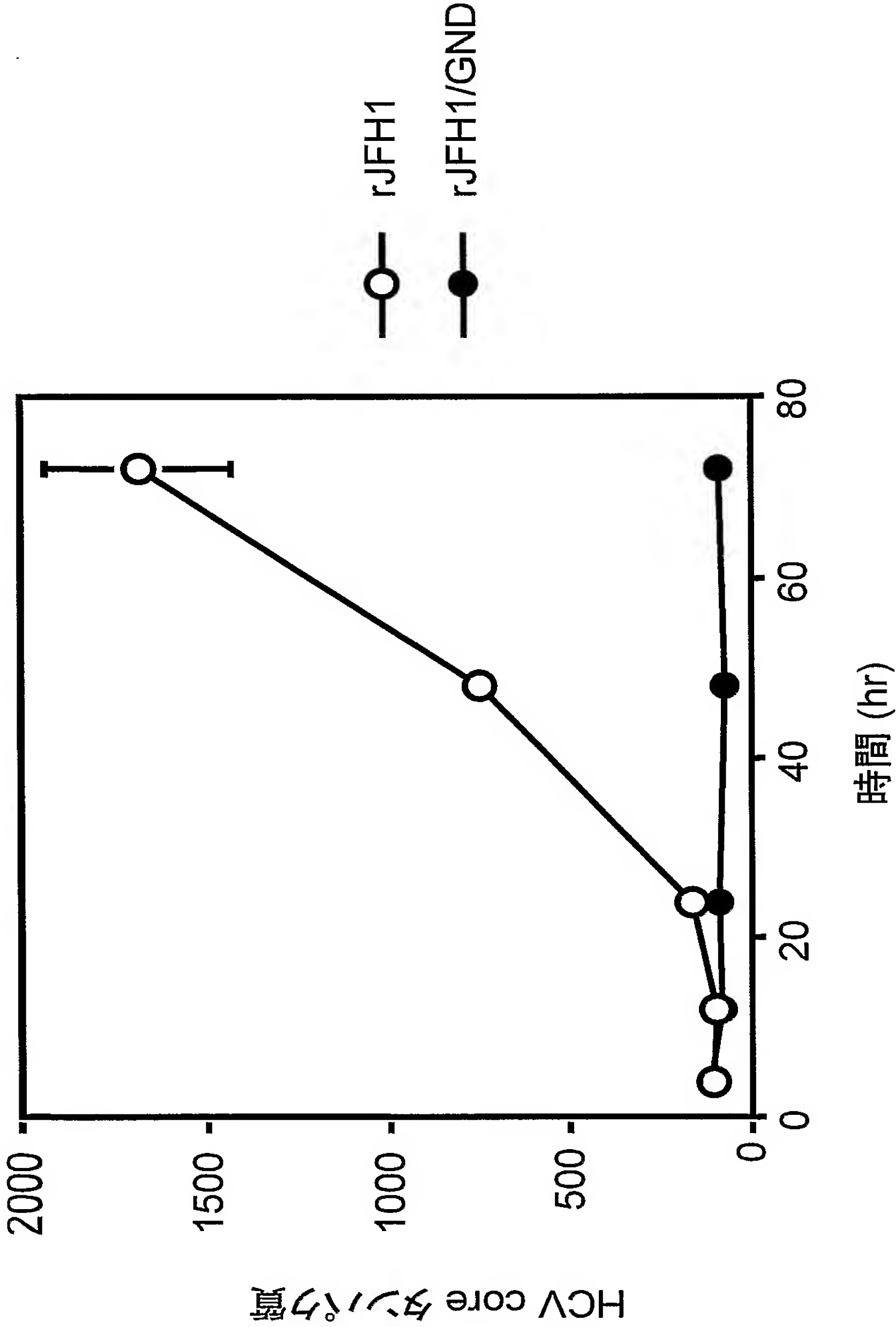


図 4

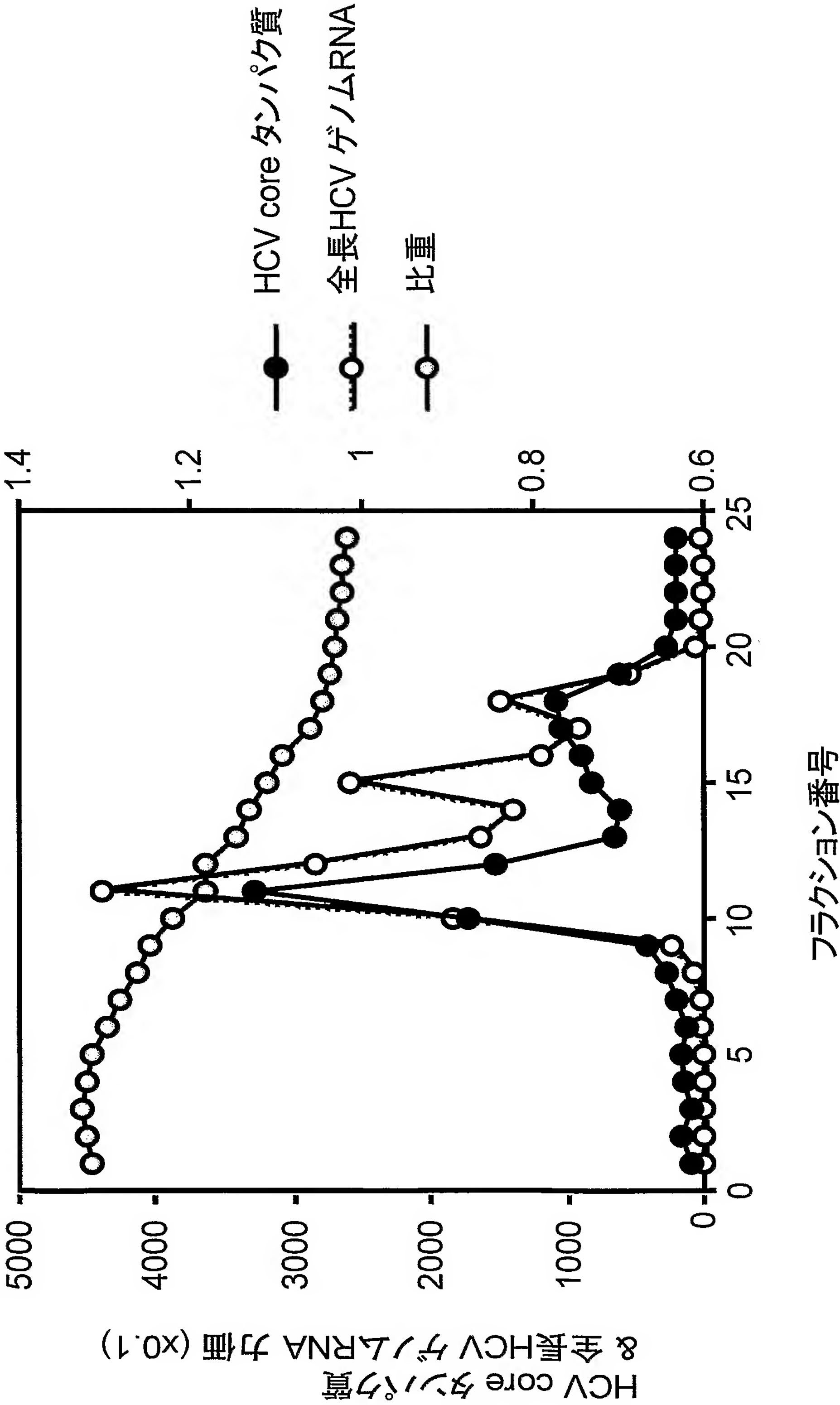
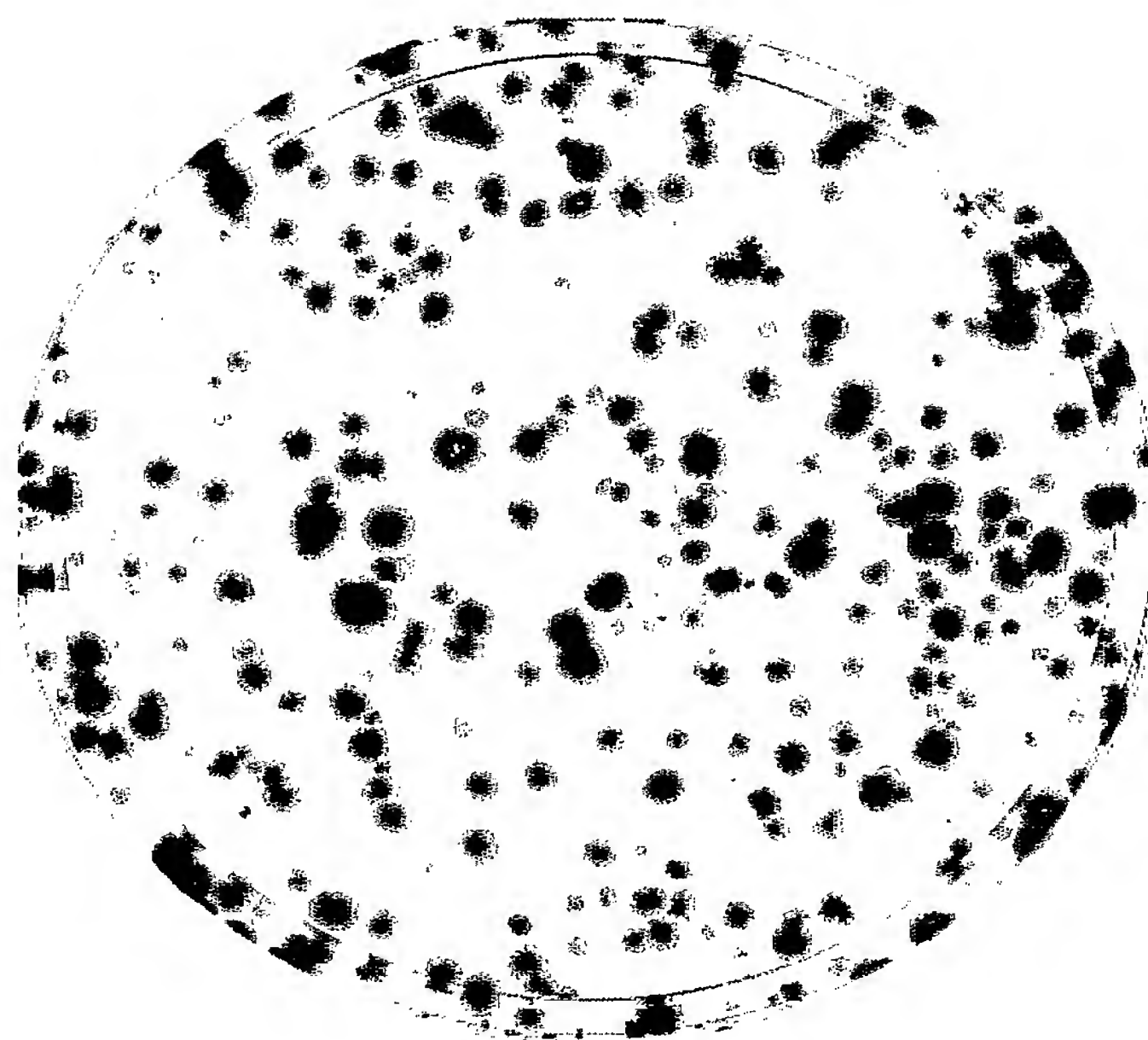
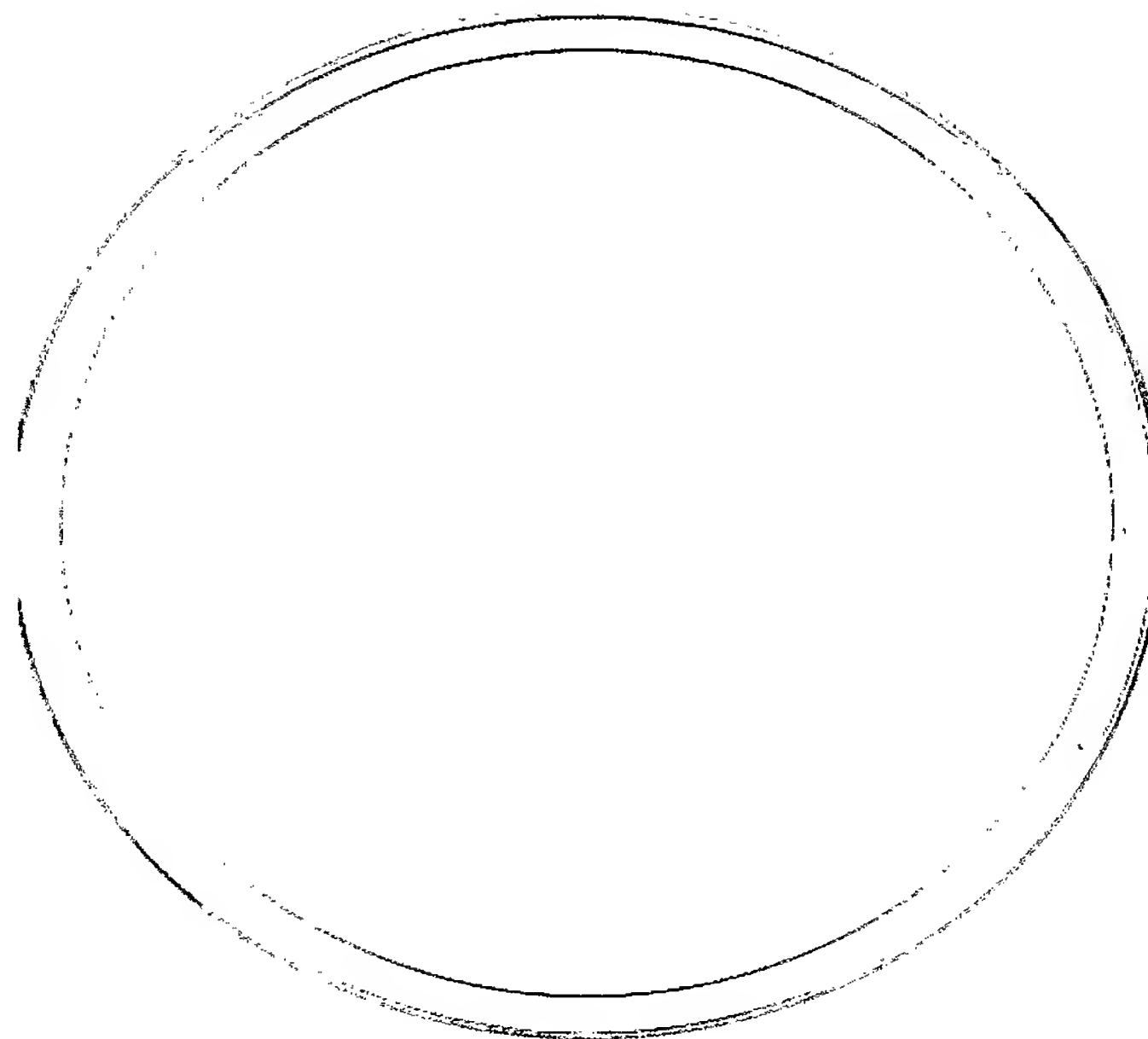


図 5



rFGREP-JFH1



rFGREP-JFH1/GND

1μg RNA トランスフェクション

図 6

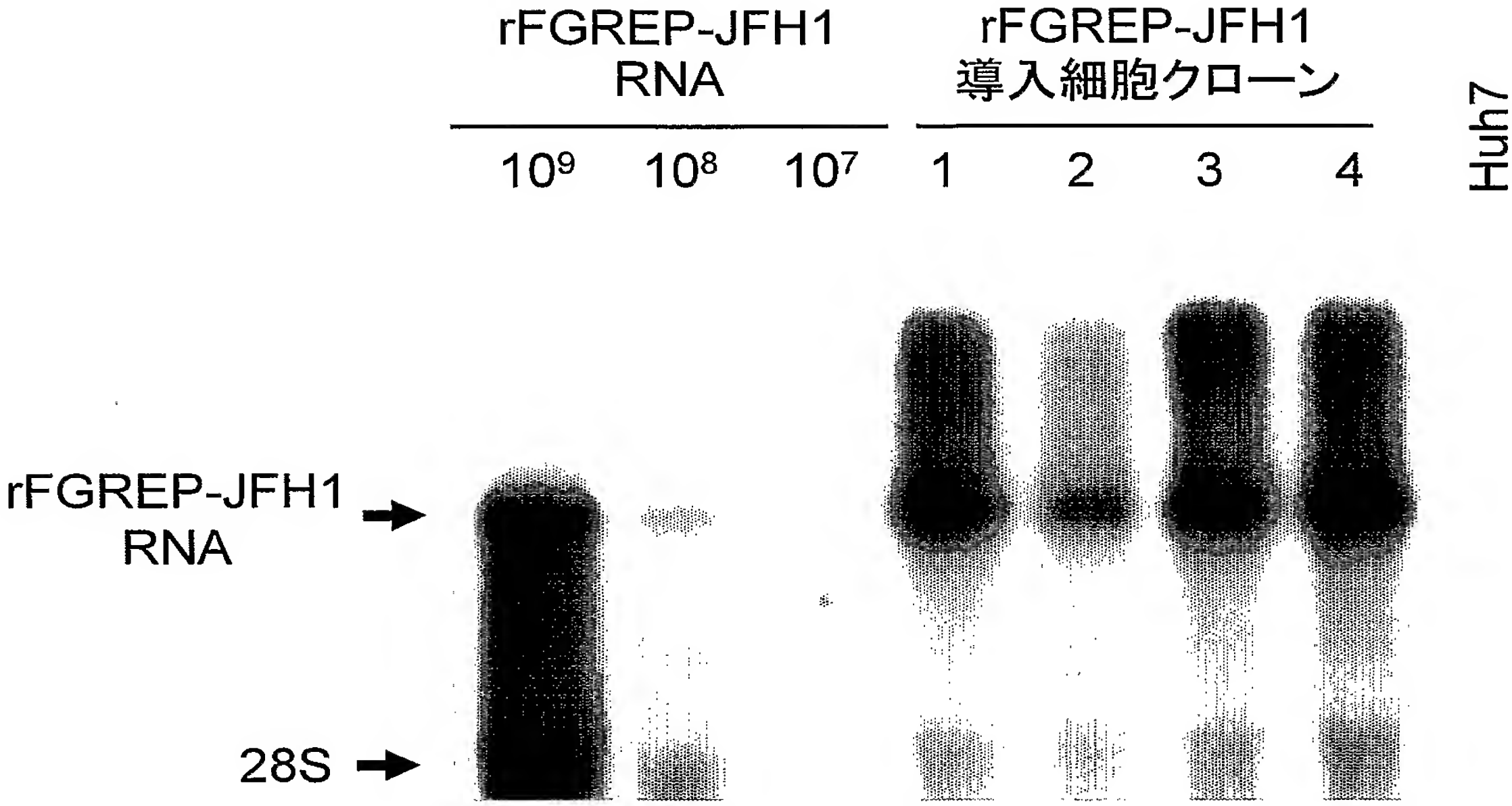


図 7

rFGREP-JFH1導入細胞クローン

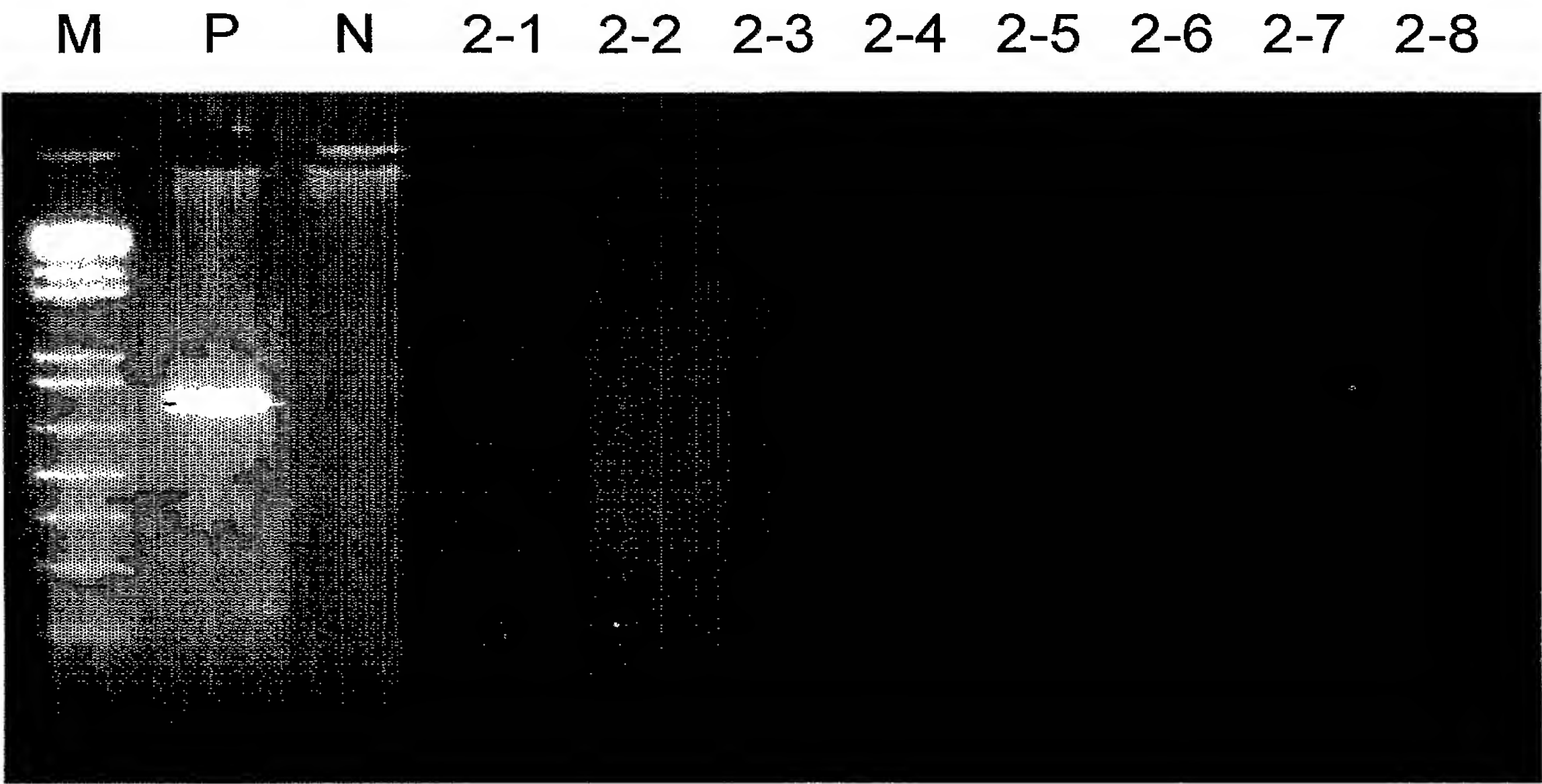


図 8

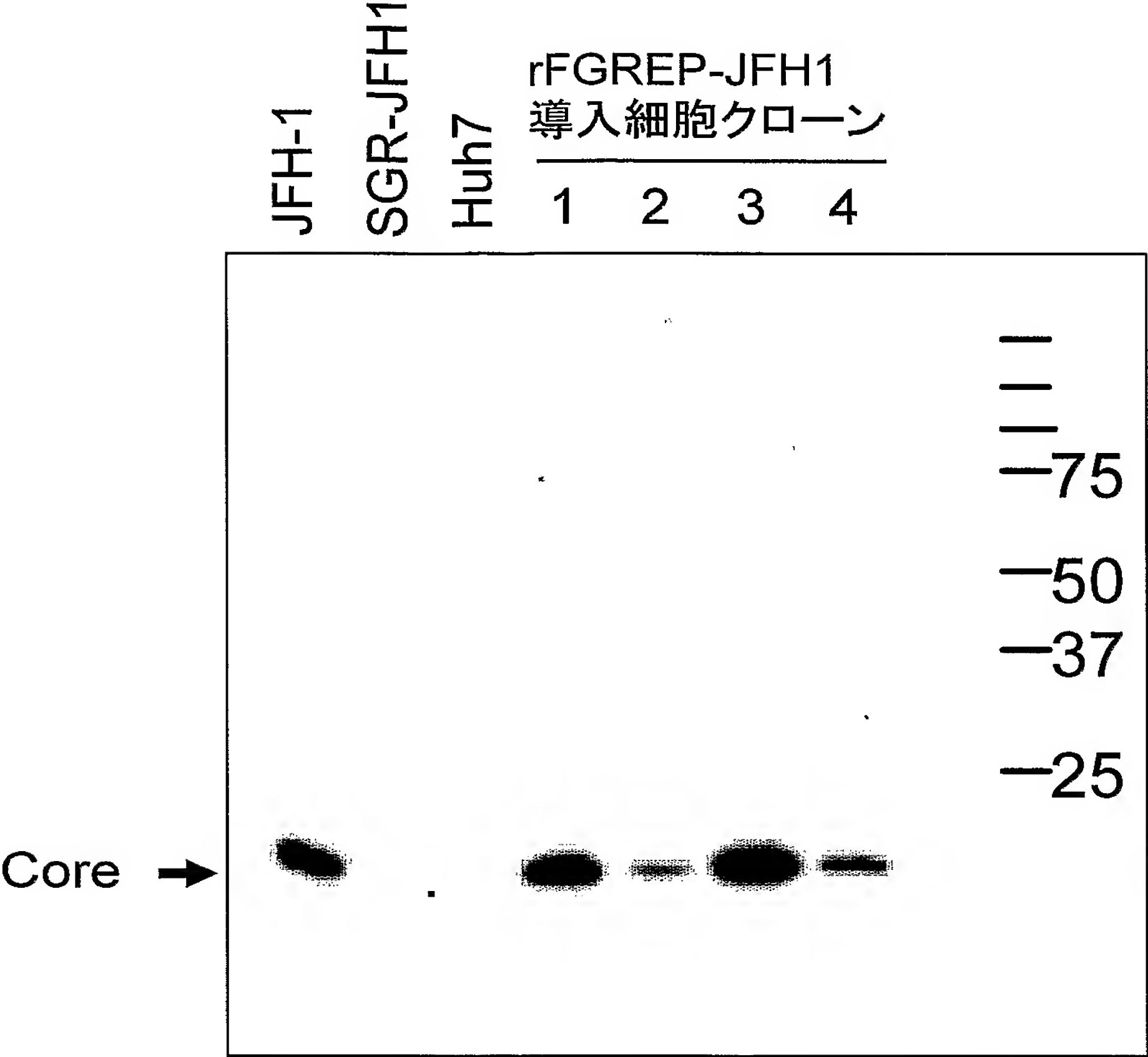


図 9

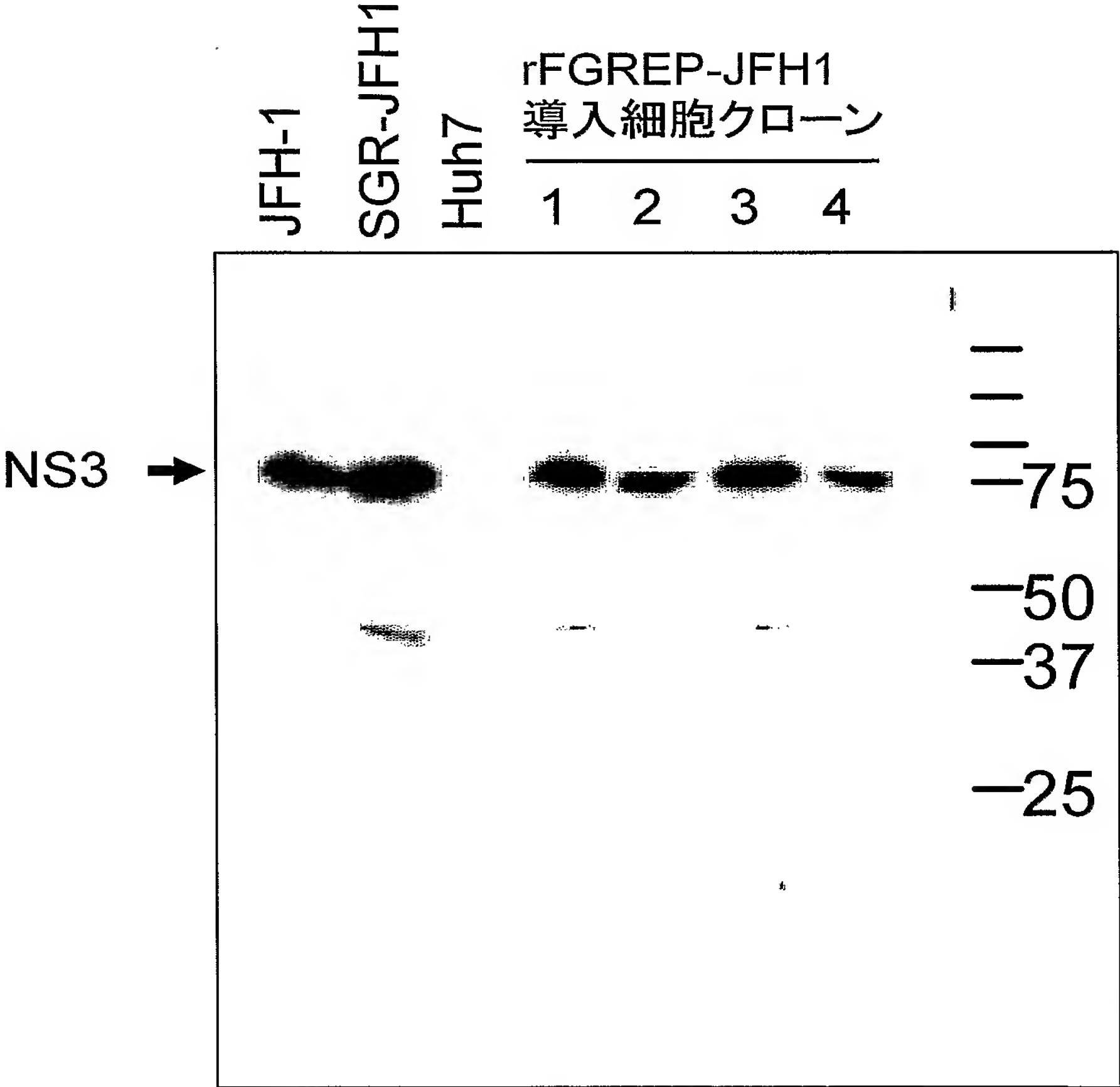


図 10

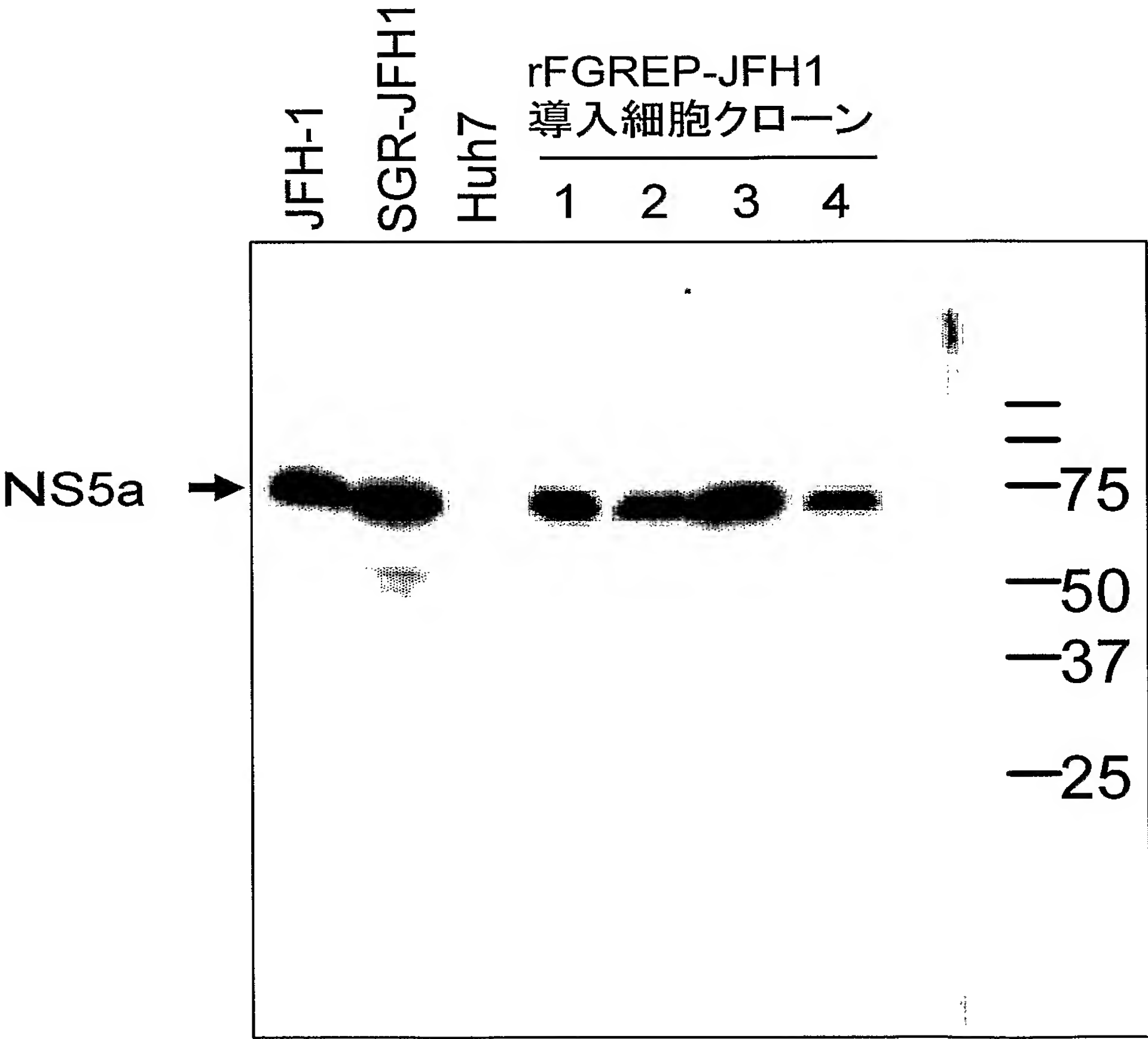


図 11

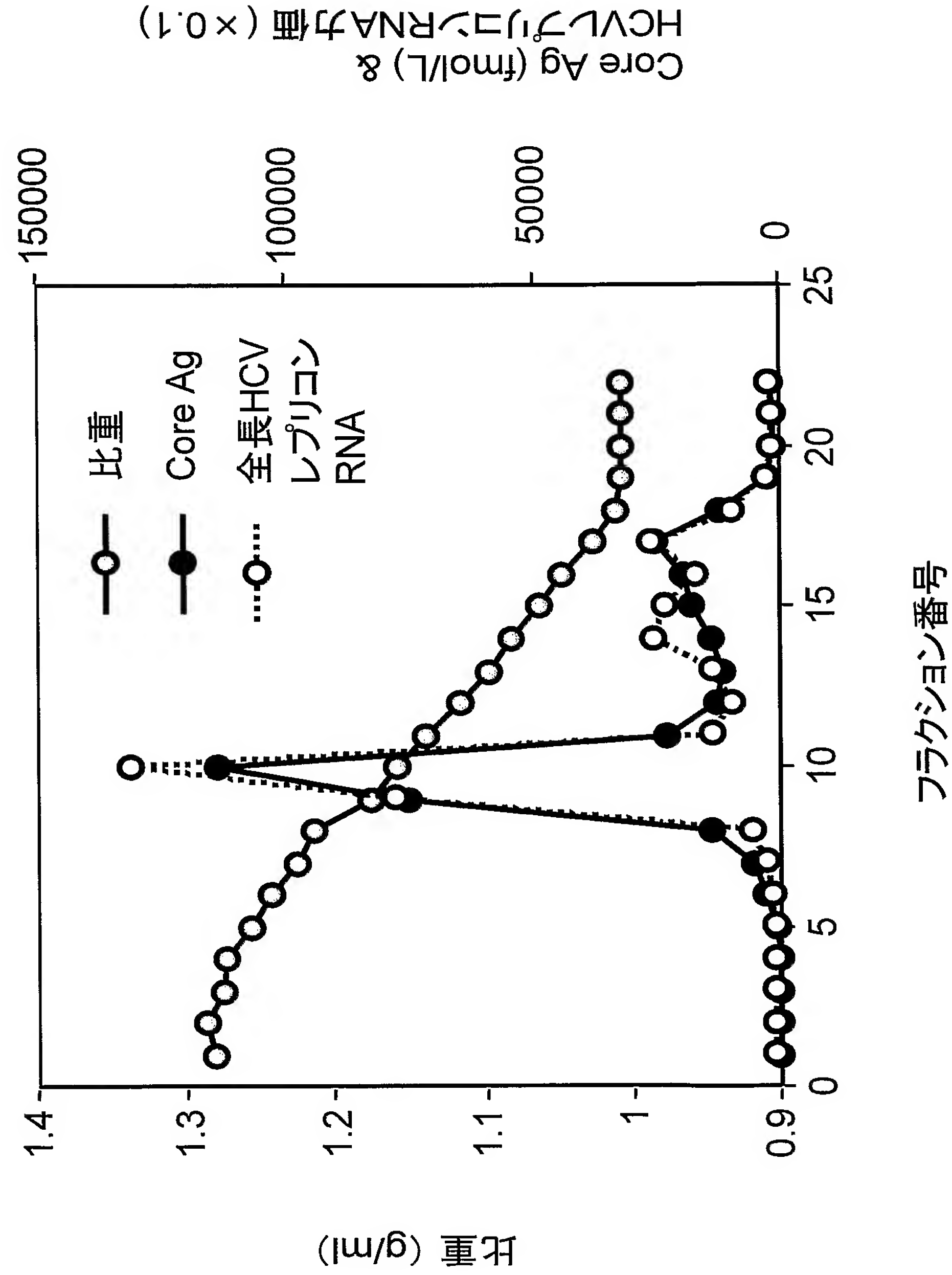
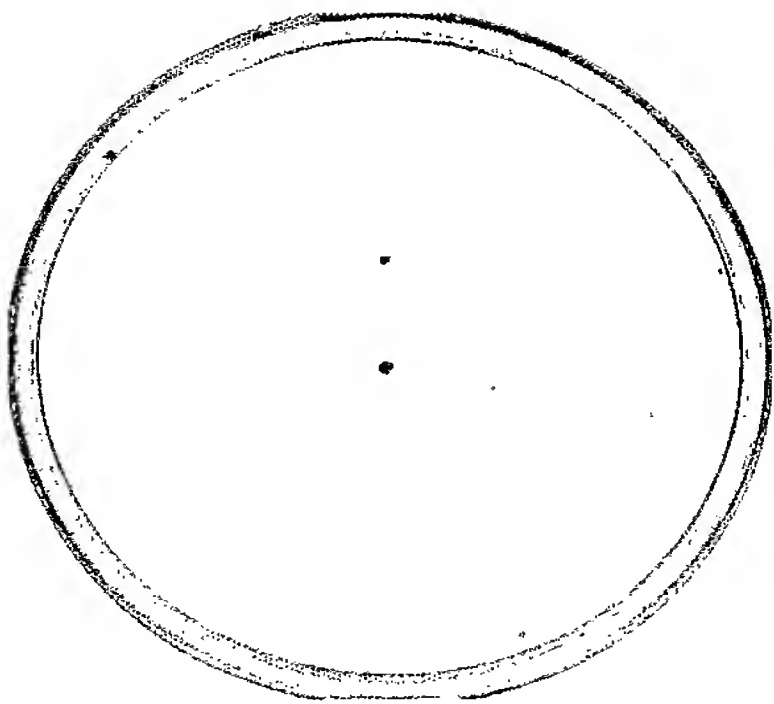
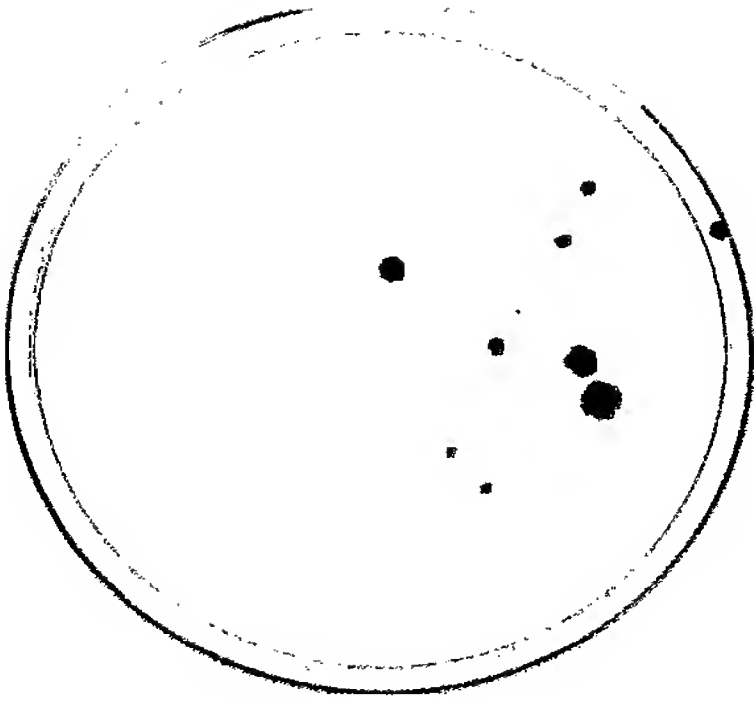


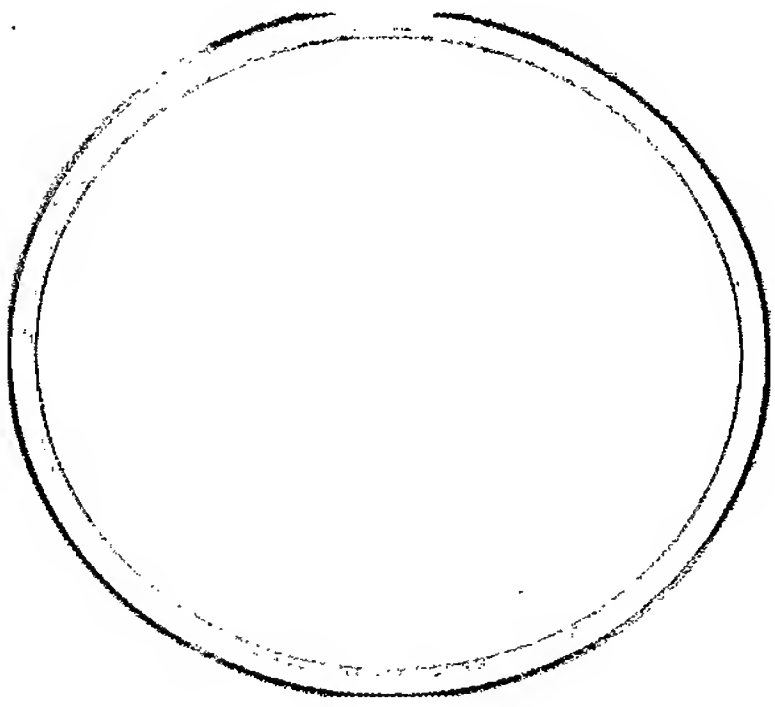
図 1 2



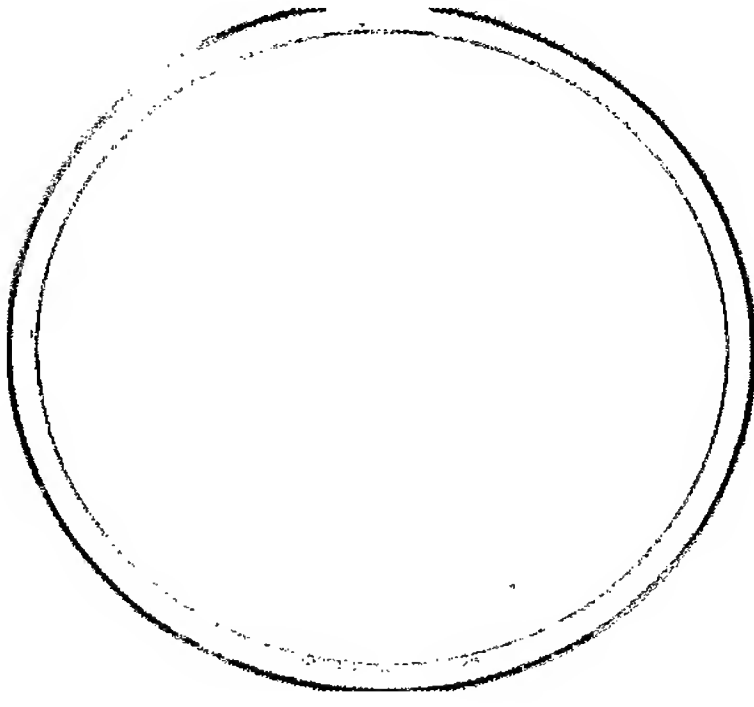
FGR-JFH1/2-3
4ml



FGR-JFH1/2-3
8ml



SGR-JFH1/4-1
4ml



SGR-JFH1/4-1
8ml

SEQUENCE LISTING

<110> Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research

Toray Industries Inc.

<120> A nucleic acid construct comprising a full-length genome of human Hepatitis C virus, a recombinant cell transfected with the same replicating the full-length virus genome, and a process for producing human Hepatitis C virus particles

<130> PH-2372-PCT

<150> JP 2004-045489

<151> 2004-02-20

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 340

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> 5' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<220>

<223> inventor: Wakita, Takaji

Inventor: Kato, Takanobu

Inventor: Date, Tomoko

Inventor: Miyamoto, Michiko

Inventor: Tanabe, Junichi

Inventor: Sone, Saburo

<400> 1

```
accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
aagacugggu ccuuucugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugccccc 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauagg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accugcacc 340
```

<210> 2

<211> 573

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> core protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 2

```
augagcacia auccuaaacc ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccagaa 60
gacguuaagu ucccgggagg cggccagauc guuggcggag uauacuuguu gccgcgcagg 120
ggccccaggu ugguugugcg cacgacaagg aaaacuucgg agcgguccca gccacgugg 180
```


agacgccagc ccauccccaa agaucggcgc uccacuggca aggccugggg aaaaccaggu 240
 cgccccuggc ccuaauaugg gaaugaggga cucggcuggg caggauggcu ccuguccecc 300
 cgaggcucuc gcccuccug gggccccacu gacccccggc auaggucgcg caacgugggu 360
 aaagucaucg acacccuaac guguggcuuu gccgaccuca ugggguacau ccccgucgua 420
 ggcgccccgc uuaguggcgc cgccagagcu gucgcgcacg gcgugagagu ccuggaggac 480
 gggguuaauu augcaacagg gaaccuaccc gguuuccccu uuucuaucuu cuugcuggcc 540
 cuguuguccu gcaucaccgu uccggucucu gc 573

<210> 3

<211> 576

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> E1 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 3

gcccagguga agaauaccag uagcagcuac auggugacca augacugcuc caaugacagc 60
 aucacuuggc agcucgaggc ugcgguucuc cacguccccc ggugcguccc gugcgagaga 120
 guggggaaua cgucacggug uugggugcca gucucgcca acauggcugu gcggcagccc 180
 ggugcccuca cgcaaggguu gcggacgcac aucgauaugg uugugauguc cgccaccuuc 240
 ugcucugcuc ucua cguggg ggaccucugu ggcgggguga ugcucgcggc ccagguguuc 300
 aucgucucgc cgca guacca cugguuugug caagaaugca auugcuccau cuaccucggc 360
 accaucacug gacaccgcau ggcaugggac augaugauga acuggucgcc cacggccacc 420
 augauccugg cgua cgugau gcgcgucccc gaggucauca uagacaucgu uagcggggcu 480
 cacuggggcg ucau guucgg cuuggccuac uucucuaugc agggagcgug ggcgaagguc 540
 auugucaucc uucugcuggc cgcuggggug gacgcg 576

<210> 4

<211> 1290

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> E2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 4

```
ggcaccacca cguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 60
agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucaac 120
cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuac 180
accaaccgcu uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 240
gcuuuccgga uaggguuggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 300
augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 360
guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccgguag uagugggcac gaccgacaga 420
cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 480
acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 540
aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 600
uugugcccuu cggauuguuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauauuaa gugugguucu 660
gggcccuggc ucacaccaa gugccugguc cacuacccuu acagacucug gcuuuacccc 720
ugcacaguca auuuuaccuu cuucaagaua agaauguaug uagggggggu ugagcacagg 780
cucacggccg caugcaacuu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga cagggacagg 840
agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggaauggg ccauccugcc cugcaccuac 900
ucagacuua cccguuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 960
cauacaugu auggccucuc accugcuauc aaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 1020
```

guacucuau uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 1080
 uuguugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 1140
 gcuaacugcc auggccuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 1200
 ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggccuu cugccuacug 1260
 cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc 1290

<210> 5

<211> 651

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS2 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 5

uaugacgcac cugugcacgg acagauaggc guggguuugu ugauauugau caccucucuc 60
 acacucaccc cgggguaaua gaccuccuc ggccaguguc uguggugguu gugcuaucuc 120
 cugaccucgg gggaagccau gauucaggag uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc 180
 cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc 240
 aaauaggcuu uggcguugcu ugggccugcu uaccucuuaa gggccgcuu gacacaugug 300
 ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg 360
 ggggguaggu auguucaggu ggcgcuaauug gcccuuggca gguggacugg caccuacauc 420
 uaugaccacc ucacaccuau gucggacugg gccgcuagcg gccugcgcga cuuagcgguc 480
 gccguggaac ccaucaucuu caguccgaug gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag 540
 acggcugcau guggggacau ucuacaugga cuucccgugu ccgcccga cu ggccaggag 600
 auccuccucg gccagcuga uggcuacacc uccaaggggu ggaagcuccu u 651

<210> 6

<211> 1893

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS3 protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 6

```
gcucccauca cugcuuau gc ccagcaaaca cgaggccucc ug ggcgcgau aguggugagu 60
augacggggc gugacaggac agaacaggcc ggggaagucc aaauccuguc cacagucucu 120
caguccuucc ucggaacaac caucucgggg guuuugugga cuguuuacca cggagcuggc 180
aacaagacuc uagccggcuu acggggguccg gucacgcaga uguacucgag ugcugagggg 240
gacuugguag gcuggcccag cccccuggg accaagucuu uggagccgug caagugugga 300
gccgucgacc uauaucuggu cacgcggaac gcugauguca ucccggcucg gagacgcggg 360
gacaagcggg gagcauugcu cuccccgaga ccgauuucga ccuugaaggg guccucgggg 420
gggccggugc ucugcccuag gggccacguc guugggcucu uccgagcagc ugugugcucu 480
cggggcgugg ccaaaucgau cgauuucauc cccguugaga cacucgacgu uguuacaagg 540
ucucccacuu ucagugacaa cagcacgcca ccggcugugc cccagaccua ucaggucggg 600
uacuugcaug cuccaacugg caguggaaag agcaccaagg uccugucgc guauggccgc 660
cagggguaca aaguacuagu gcuuaacccc ucgguagcug ccaccucggg guuuggggcg 720
uaccuaucca aggcacaugg caucaauccc aacauuagga cuggagucag gaccgugaug 780
accggggagg ccaucacgua cuccacauau ggcaauuuc ucgccgaugg gggcugcgcu 840
agcggcgccu augacaucau cauau gcgau gaaugccacg cuguggaugc uaccuccauu 900
cucggcaucg gaacgguccu ugaucaagca gagacagccg gggucagacu aacugugcug 960
gcuacggcca cccccccgg gucagugaca acccccacuc ccgauauaga agagguaggc 1020
cucgggcggg agggugagau cccuucuaau gggagggcga uccccuau cugcaucaag 1080
```


ggagggagac accugauuuu cugccacuca aagaaaaagu gugacgagcu cgcggcggcc 1140
 cuucgggggca ugggcuugaa ugccguggca uacuauagag gguuggacgu cuccauaaua 1200
 ccagcucagg gagauguggu ggucgucgcc accgacgcc ucaugacggg guacacugga 1260
 gacuuugacu ccgugaucga cugcaaugua gcggucaccc aagcugucga cuucagccug 1320
 gaccccaccu ucacuauaac cacacagacu gucccacaag acgcugucuc acgcagucag 1380
 cgccgcgggc gcacagguag aggaagacag ggcacuuaua gguauguuuc cacuggugaa 1440
 cgagccucag gaauguuuga caguguagug cuuugugagu gcuacgacgc aggggcugcg 1500
 ugguacgauc ucacaccage ggagaccacc gucaggcuua gagcguauuu caacacgccc 1560
 ggccuacccg ugugucaaga ccaucuugaa uuuugggagg caguuuucac cggccucaca 1620
 cacauagacg cccacuuccu cucccaaaca aagcaagcgg gggagaacuu cgcguaccua 1680
 guagccuacc aagcuacggg gugcgccaga gccaaggccc cuccccguc cugggacgcc 1740
 auguggaagu gccuggcccg acucaagccu acgcuugcgg gccccacacc ucuccuguac 1800
 cguuugggcc cuauuaccaa ugaggucacc cucacacacc cugggacgaa guacaucgcc 1860
 acaugcaugc aagcugaccu ugaggucaug acc 1893

<210> 7

<211> 162

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS4A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 7

agcacguggg uccuagcugg aggaguuccg gcagccgucg ccgcauauug ccuggcgacu 60
 ggaugcguuu ccaucaucgg ccgcuugcac gucaaccage gagucgucgu ugcgccggau 120
 aaggaggucc uguaugagge uuuugaugag auggaggaau gc 162

<210> 8

<211> 783

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS4B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 8

```

gccucuaggg cggcucucau cgaagagggg cagcggauag ccgagauguu gaaguccaag 60
auccaaggcu ugcugcagca ggccucuaag caggcccagg acauacaacc cgcuaugcag 120
gcuucauggc ccaaagugga acaauuuugg gccagacaca uguggaacuu cauuaugcgc 180
auccaauacc ucgcaggauu gucaacaacug ccagggaacc ccgcgguggc uuccaugaug 240
gcauucagug ccgccucac caguccguug ucgaccagua ccaccauccu ucucaacauc 300
augggaggcu gguuagcguc ccagaucgca ccacccgcgg gggccaccgg cuuugucguc 360
aguggccugg ugghggcugc cgugggcagc auaggccugg guaaggugcu gguggacauc 420
cuggcaggau auggugcggg cauucgggg gccucgucg cauucaagau caugucuggc 480
gagaagcccu cuauggaaga ugucaucaau cuacugccug ggauccuguc uccgggagcc 540
cugguggugg gggucaucug cgcggccauu cugcgccgcc acgugggacc gggggagggc 600
gcgguccaau ggaugaacag gcuuauugcc uuugcuucca gaggaacca cgucgccccu 660
acucacuacg ugacggaguc ggaugcgucg cagcguguga cccaacuacu uggcucucuu 720
acuauaacca gccuacucag aagacuccac aauggauaa cugaggacug cccauccca 780
ugc

```

<210> 9

<211> 1398

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS5A protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 9

```
uccggauccu ggcuccgcga cgugugggac uggguuugca ccaucuugac agacucaaa 60
aauuggcuga ccucuaaaau guuccccaag cugcccggcc ucccuuucan cucuugucan 120
aagggguaca agggugugug ggccggcacu ggcaucauga ccacgcgcug ccuugcggc 180
gccaacauau cuggcaaugu ccgccugggc ucuauagaga ucacagggcc uaaaaccugc 240
augaacaccu ggcaggggac cuuuccuaua aauugcuaca cggagggcca gugcgcgcgc 300
aaacccccca cgaacuacaa gaccgccauc uggagggugg cggccucgga guacgcggag 360
gugacgcagc augggucgua cuccuaugua acaggacuga ccacugacaa ucugaaaaau 420
ccuugccaac uaccuucucc agaguuuuuc uccugggugg acggugugca gaucgauagg 480
uuugcaccca caccaaagcc guuuuuccgg gaugaggucu cguucugcgu ugggcuuaau 540
uccuaugcug ucggguccca gcuucccugu gaaccugagc ccgacgcaga cguauugagg 600
uccaugcuua cagaucggcc ccacauacg gcggagacug cggcgcggcg cuuggcacgg 660
ggaucaccuc caucugaggc gaguccuca gugagccagc uaucagcacc gugcugcgg 720
gccaccugca ccaccacag caacaccuau gacguggaca uggucgaugc caaccugcuc 780
auggagggcg guguggcuca gacagagccu gaguccaggg ugcccguucu ggacuucuc 840
gagccaaugg ccgaggaaga gagcgaccuu gagcccucaa uaccaucgga gugcaugcuc 900
cccaggagcg gguuuccacg ggccuuaccg gcuugggcac ggccugacua caaccgccc 960
cucguggaau cguggaggag gccagauuac caaccgcca ccguugcugg uugugcucuc 1020
cccccccca agaaggcccc gacgccuccc ccaaggagac gccggacagu gggucugagc 1080
gagagcacca uaucagaagc ccuccagcaa cuggccauca agaccuuugg ccagcccccc 1140
ucgagcggug augcaggcuc guccacgggg gcgggcgcgc ccgaauccgg cgguccgacg 1200
```

uccccuggug agccggcccc cucagagaca gguuccgccu ccucuaugcc cccccucgag 1260
 ggggagccug gagaucgga ccuggagucu gaucagguag agcuucaacc ucccccccag 1320
 gggggggggg uagcucccg uucgggcucg gguucuuggu cuacuugcuc cgaggaggac 1380
 gauaccaccg ugugcugc 1398

<210> 10

<211> 1773

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> NS5B protein-coding sequence of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 10

uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacucccu guagccccga agaggaaaag 60
 uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcga uacc auaacaaggu guacuguaca 120
 acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac gcaagugcuc 180
 gacgcccauu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa ggucagcgca 240
 aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc aagauccaag 300
 uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa ccacaucaag 360
 uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaac caucauggcc 420
 aaaaauaggg uguucugcgu ggacccccgc aaggggggua agaaaccagc ucgccucauc 480
 guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gaga aaugg cccucuauga cauuaacaa 540
 aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuucc aguacucccc ugcccaacgg 600
 guggaguauc ucuugaaagc augggcggaa aagaaggacc ccauggguuu uucguaugau 660
 acccgaugcu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga guccauauac 720
 caggccugcu ccugccccga ggaggccgc acugccauac acucgcugac ugagagacuu 780


```

uacguaggag ggcccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag acguugccgc 840
gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuaugu gaaagcccua 900
gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaaugc ugguaugcgg cgaugaccua 960
guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag agccuucacg 1020
gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga auaugaccug 1080
gagcuaauaa cauccuguuc cucaaaugug ucuguggcgu ugggcccgcg gggccgccgc 1140
agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug ggaaacaguu 1200
agacacuccc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc aaccauaugg 1260
guucgcaugg uccuaaugac acacuucuuc uccaauuca ugguccaaga caccucggac 1320
cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu ggaccuucca 1380
gccauaaug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacaua cucucaccac 1440
gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu caggguugg 1500
aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggagggaa agcggccguu 1560
ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac uccauugccg 1620
gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccgucg gcgccggcgg gggcgacauu 1680
uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgcg ucauuacucu ucggccuacu ccuacuuuuc 1740
guagggguag gccucuuccu acuccccgcg cg 1773

```

<210> 11

<211> 239

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> 3' non-translated region of hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 11

uagagcggca cacacuaggu acacuccaau gcuaacuguu cccuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucuca 120
 ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa 180
 agguccguga gccgcaugac ugcagagagu gccguaacug gucucucugc agaucaugu 239

<210> 12

<211> 9707

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<220>

<223> full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 12

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
 cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
 gagugucgua cagccuccag gccccccccc cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
 ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
 cccggccaau ugggcgugcc cccgcaagac ugcuaagcca guagcguugg guugcgaaag 300
 gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
 caccaugagc acaaauccua aaccucaaag aaaaaccaa agaaacacca accgucgccc 420
 agaagacguu aaguucccg gcggcggcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
 caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggu cccagccacg 540
 ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
 aggucgcccc uggccccuau augggaauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
 cccccgaggc ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
 ggguaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucaugggggu acauccccgu 780
 cguaggcgcc ccgcuuagug gcgccgccag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840

ggacgggguu aaauaugcaa cagggaaccu acccgguuuc ccuuuuucua ucuucuugcu 900
ggcccuguug uccugcauca ccguuccggu cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
gguucuccac guccccgggu gcgucccgug cgagagagug gggaauacgu cacgguguug 1080
ggugccaguc ucgccaaca uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140
gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguucauc gucucgccgc aguaccacug 1260
guuugugcaa gaaugcaauu gcuccaucua ccugggcacc aucacuggac accgcauggc 1320
augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auctcuggcg acgugaugcg 1380
cgucggcgag gucaucauag acaucguuag cgggggcucac uggggcguca uguucggcuu 1440
ggccuacuuc ucuauagcagg gagcgugggc gaaggucauu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuaaca ccaacggcag 1620
uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucugc 1680
ggccuuguuc uacaccaacc gcuuuaacuc gucagggugu ccagggcgcc uguccgccug 1740
ccgcaacauc gaggcuuucc ggauagggug gggcacccua caguacgagg auaaugucac 1800
caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuucacc ccagcccgg uaguaguggg 1920
cacgaccgac agacguggag ugcccaccua ccaugggga gagaaugaga cagaugucu 1980
ccuacugaac agcaccgac cgccgcaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggaugaacuc 2040
cacugguuuc accaagacuu guggcgcgcc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuauau 2160
uaaguguggu ucugggccc uggcucacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
cuggcauuac ccugcacag ucauuuuuac caucucaag auaagaangu auguaggggg 2280
gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgu gcgacuugga 2340
ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggauu gggccauccu 2400
gccugcacc uacucagacu uacccgcuuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460
caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucaaaaau acgucguucg 2520
augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcu 2580

guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
cgcugcgagu gcggcuaacu gccauggccu ccuauauuuu gccaucuucu ucguggcagc 2700
uuggcacauc aggggucggg ugguccccuu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760
cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuaugacg caccugugca 2820
cggacagaua ggcguggguu uguugauuuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880
uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugacc cugggggaagc 2940
caugauucag gaguggguac cacccaugca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000
ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060
gcuugggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
ucacgcucug auaaggguau gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguuca 3180
gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuaugacc accucacacc 3240
uaugucggac ugggccgcua gcggccugcg cgacuagcg gucgccgugg aaccacaucau 3300
cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
cauucuacau ggacuucccg uguccgccg acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420
ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcucc aucacugcuu augcccagca 3480
aacacgaggc cuccugggcg ccuaguggu gaguaugacg gggcgugaca ggacagaaca 3540
ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccaucuc 3600
ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660
uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucucccc 3840
gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900
cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucucc acuuucagug acaacagcac 4020
gccaccgcu gugccccaga ccuauaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
aaagagcacc aagguccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
ccccucggua gcugccacc ugggguuugg ggcguaccua uccaaggcac auggcauca 4200
ucccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
auauggcaaa uuucucgccg augggggcug cgcuagcggc gccuaugaca ucaucauauug 4320

cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 agcagagaca gccgggguca gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc caucccgauc uagaagaggu aggccucggg cgggagggug agaucccccuu 4500
 cuaugggagg gcgauucucc uauccugcau caagggaggg agacaccuga uuuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaaugccgu 4620
 ggcauacuau agagggguugg acgucuccau aaauaccagcu cagggagaug ugguggucgu 4680
 cgccaccgac gcccucauga cggggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800
 gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccgc gggcgcacag guagaggaag 4860
 acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
 agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
 caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccggccua cccguguguc aagaccaucu 5040
 ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacaua gacgccacu uccucuccca 5100
 aacaaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcgc 5160
 cagagccaag gcccucuccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacucua 5220
 gccuacgcuu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccaaugaggu 5280
 caccucaca caccugggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340
 caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccg cauauugccu 5400
 ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
 gccggauaag gagguccugu augaggcuuu ugaugagaug gaggaaugcg ccucuagggc 5520
 ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcuu 5580
 gcugcagcag gccucuaagc agggccagga cauacaaccc gcuaugcagg cuucauggcc 5640
 caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
 cgcaggauug ucaacacugc cagggaaccc cgcgguggcu uccaugaugg cauucagugc 5760
 cgccucacc aguccguugu cgaccaguac caccauccuu cucaacauca ugggaggcug 5820
 guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg ggccaccggc uuugucguca guggccuggu 5880
 gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacaucc uggcaggaua 5940
 uggugcgggc auuucggggg ccucgucgc auucaagauc augucuggcg agaagcccuc 6000
 uauggaagau gucaucaauc uacugccugg gauccugucu ccgggagccc uggugguggg 6060

ggucaucugc gcggccauuc ugcgccgcca cgugggaccg ggggagggcg cgguccaauug 6120
 gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac gucgcccua cucacuacgu 6180
 gacggagucg gaugcgucgc agcgugugac ccaacuacuu ggcucucua cuauaaccag 6240
 ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc cccaucccau gcuccggauc 6300
 cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccaucuug acagacuua aaaauuggcu 6360
 gaccucuaaa uuguucccca agcugcccgg ccuccccuuc aucucuuguc aaaaggggua 6420
 caagggugug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugcg gcgccaacau 6480
 cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacaggg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540
 cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcg cgaaccccc 6600
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggagggu ggcggccucg gaguacgcg aggugacgca 6660
 gcaugggucg uacuccuauug uaacaggacu gaccacugac aaucugaaaa uuccuugcca 6720
 acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacaccaaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucugc guugggcua auuccuauugc 6840
 ugucgggucc cagcuucccu gugaaccuga gcccgacgca gacguauuga gguccaugcu 6900
 aacagauccg cccacauca cggcggagac ugcggcgcg cgcuuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 caccaccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau gccaaccugc ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccgua cuggacuuc ucgagccaau 7140
 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccaucg gagugcaugc ucccagagg 7200
 cggguuucca cgggccuuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgcucgugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgcc caccguugcu gguugugcuc ucccccccc 7320
 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucagaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagccc ccucgagcgg 7440
 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcgc cgccgaaucc ggcggucga cguccccug 7500
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucuaug cccccccuc agggggagcc 7560
 uggagauccg gaccuggagu cugaucaggu agagcuuaa ccucccccc aggggggggg 7620
 gguagcuccc gguucgggcu cggggucuuug gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacuccu guagccccga 7740
 agaggaaaag uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu 7800

guacuguaca acaucaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 gcaagugcuc gacgcccuuu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagegca aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc 7980
 aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaa 8100
 caucauggcc aaaaauaggg uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160
 ucgccucauc guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaugg cccucuauga 8220
 cauucacaa aagcuuccuc aggcgguaau ggagacuucc uauggcuucc aguacuccc 8280
 ugcccacgg guggaguauc ucuugaaagc augggcgga aagaaggacc ccauggguuu 8340
 uucguaugau acccgaugcu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
 guccauauac caggccugcu ccugcccga ggaggccgc acugccauac acucgcuagc 8460
 ugagagacuu uacguaggag ggccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
 acguugccgc gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuau 8580
 gaaagccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaugc ugguaugcgg 8640
 cgaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugcccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 auaugaccug gagcuauaa cauccuguuc cucaaauug ucuguggcgu ugggccgcg 8820
 gggccgccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugcug 8880
 ggaaacaguu agacacucc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguauccucc 8940
 aaccuauagg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuu uccauucua ugguccaaga 9000
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauc guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauauug agagguuaca cgggcuugac gccuuuucua ugcacacua 9120
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccuu 9180
 caggguuggg aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggaggga 9240
 agcggccguu ugcggccgau aucucucaa uugggcggug aagaccaagc ucaaacuac 9300
 uccauugccg gaggcgcgc uacuggacuu auccaguugg uucaccguc gcgccggcg 9360
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgacccgc ucauuacucu ucggccuacu 9420
 ccuacuuuuc guagggguag gccucuuccu acuccccgc cgguagagcg gcacacacua 9480
 gguacacucc auagcuacu guuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 9540

```

uuuuuuuuucu uuuuuuuuuuu uuucccucuu ucuucccuuc ucaucuuaau cuacuuucuu 9600
ucuugguggc uccaucuag ccuagucac ggcua gcugu gaaagguccg ugagccgcau 9660
gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagaucan gucuaga 9707

```

<210> 13

<211> 11111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone

<400> 13

```

accugcccu aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaaugccggg 180
aagacugggu ccuuucuugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgcccraag auugaacaag auggauugca 420
cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuauucggc uaugacuggg cacaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc cgguucuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag cgcggcuau 600
guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca cugaagcggg 660
aaggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau cucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaacca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua cgcuugaacc 780
ggcuaccugc ccauucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840

```

ggaagccggu cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
 cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgcgau gcccgcacggc gaggaucucg ucgugacca 960
 uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauggc cgcuuuucug gauucaucga 1020
 cuguggccgg cugggugugg cggaccgcua ucaggacaua gcuugggcua cccgugauau 1080
 ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
 ucccgaucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucugac gaguucucu gaguuuaaac 1200
 ccucuccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
 cguuugucua uauguuauuu uccaccuauu ugccgucuuu uggcaaugug agggcccga 1320
 aaccuggccc ugucuuucug acgagcauuc cuaggggucu uuccccucuc gccaaaggaa 1380
 ugcaaggucu guugaauguc gugaaggag caguuccucu ggaagcuuc ugaagacaaa 1440
 caacgucugu agcgaccuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac aggugccucu 1500
 gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
 uugugaguug gauaguugug gaaagaguca aauggcucuc cucaagegua uucaacaagg 1620
 ggcugaagga ugcccagaag guaccccauu guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
 caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacgucu agggcccccg aaccacgggg 1740
 acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caauccuaa accucaaaga 1800
 aaaacaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacguua aguucccggg cggcggccag 1860
 aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc aggggccccca gguugggugu gcgcacgaca 1920
 aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccauccc caaagaucgg 1980
 cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgccccu ggccccuaua ugggaaugag 2040
 ggacucggcu gggcaggau gcuucugucc ccccgaggcu cucgccccuc cuggggcccc 2100
 acugaccccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguca ucgacaccu aacguguggc 2160
 uuugccgacc ucauggggua caucccguc guaggcgccc cgcuuagugg cgccgccaga 2220
 gcugucgcgc acggcgugag aguccuggag gacggggua auuaucaac agggaaccua 2280
 cccgguuucc ccuuuucua cuucucugc gcccuguugu ccugcaucac cguuccgguc 2340
 ucugucgccc aggugaagaa uaccaguagc agcuacaugg ugaccauga cugcucaau 2400
 gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guucuccacg ucccgggug cgucccguc 2460
 gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcg 2520
 cagcccggug ccucacgca gggucugcg acgcacaucg auaugguugu gauguccgcc 2580

accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucuguggcg gggugaugcu cgcggcccag 2640
 guguucaucg ucucgccgca guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucuaac 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugaggacauga ugaugaacug gucggcccacg 2760
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc gucccccagg ucaucauaga caucguuagc 2820
 ggggcucacu ggggcgucan guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcguggggcg 2880
 aaggucauug ucauccuucu gcuggccgcu gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgugugug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg ccucagcag 3000
 aacauucagc ucauuaacac caacggcagu uggcacauca accguacugc cuugaauugc 3060
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuaacucg 3120
 ucaggguguc cagggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauagggugg 3180
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aauccagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaguc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360
 acauggggag agaauagagac agaugucuuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 uuuaggaagc auccugaugc cacuuauauu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600
 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggcuuuacc ccugcacagu cauuuuuacc 3660
 aucuucaaga uaagaaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 uucacucgug gggaucgcug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaaug ggccauccug ccugcaccu acucagacuu acccgcuug 3840
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugaggaguggg ugguacucuu auuccugcuc 3960
 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggaugcuca ucuuguuggg ccaggccgaa 4020
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuaacug ccauggccuc 4080
 cuauauuuug ccaucuucuu cguggcagcu uggcacauca ggggucgggu ggucuccuug 4140
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuaug ccuaugacgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260
 aucaccucuu ucacacucac cccgggguan aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320

uugugcuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 gugcgcggcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaaauaggcu uuuggcguug cuuggggccug cuuaccucuu aaggggccgc 4500
 uugacacaug ugccguacu ugcucagagcu cacgcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560
 aagcagcucg cgggggguag guauguucag guggcgcua uggcccuugg cagguggacu 4620
 ggcaccuaca ucuauagacca ccucacaccu augucggacu gggccgcua cggccugcgc 4680
 gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguucca uggagaagaa ggucaucguc 4740
 uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacaug gacuucccg uuccgcccga 4800
 cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
 cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggcgc cauaguggug 4920
 aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980
 ucucaguccu uccucggaac aaccaucucg gggguuuugu ggacuguua ccacggagcu 5040
 ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccgucacgc agauguacuc gagugcugag 5100
 ggggacuugg uaggcuggcc cagccccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
 ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccggc ucggagacgc 5220
 ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agacccauuu cgaccuugaa gggguccucg 5280
 ggggggcccgg ugcucugccc uagggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcuguguc 5340
 ucucggggcg uggccaaauc caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
 aggucuccca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugccccagac cuaucagguc 5460
 ggguacuugc augcuccaac uggcagugga aagagcacca aggucccuu cgcguaugcc 5520
 gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac ccucggguag cugccaccu gggguuuggg 5580
 gcguaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
 augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700
 gcuagcggcg ccuaugacau caucauagc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaaccuc 5760
 auucucggca ucggaacggu ccuugaucua gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
 cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880
 ggccucgggc gggaggguga gaucccuuc uaugggaggg cgauucccu auccugcauc 5940
 aaggagggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
 gcccuucggg gcaugggcuu gaugccgug gcauacuua gagggguugga cgucuccaua 6060

auaccagcuc agggagaugu gguggucguc gccaccgacg ccucaugac gggguacacu 6120
 ggagacuuug acuccgugau cgacugcaau guagcgguca cccaagcugu cgacuucage 6180
 cuggacccca ccuucacuau aaccacacag acugucccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
 cagcgccgcg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uuccacuggu 6300
 gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uuucaacacg 6420
 cccggccuac ccguguguca agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuuu caccggccuc 6480
 acacacauag acgcccacuu ccucucccaa acaaagcaag cggggggagaa cuucgcguac 6540
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccucucccc guccugggac 6600
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660
 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc acccucacac acccugggac gaaguacauc 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 guccuggcag ccgucgcgcg auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900
 gaugagaugg aggaaugcgc cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aaauuugggc cagacacaug 7080
 uggaacuuca uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200
 accauccuuc ucaacaucuu gggaggcugg uuagcguccc agaucgcacc acccgcgggg 7260
 gccaccggcu uugucgucag uggccuggug ggggcugccg ugggcagcau aggccugggu 7320
 aaggugcugg uggacauccu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380
 uucaagauga ugucuggcga gaagcccucu auggaagaug ucaucaaucu acugccuggg 7440
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgccgccac 7500
 gugggaccgg gggagggcgc gguccaugg augaacaggc uuauugccuu ugcuuccaga 7560
 ggaaaccacg ucgccccuac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620
 caacuacuug gcucucuuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccacaa uuggauaacu 7680
 gaggacugcc ccaucccaug cuccggaucc uggcuccgcg acguguggga cuggguuugc 7740
 accaucuuga cagacuucua aaauuggcug accucuaaa uguuccccaa gcugcccggc 7800

cuccuccuua ucucuuguca aaagggguac aagggugugu gggccggcac uggcaucaug 7860
 accacgcgcg gcccuugcgg cgccaacauc ucuggcaaug uccgccuggg cucuaugagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 acggagggcc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040
 gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuaugu aacaggacug 8100
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160
 gacggugugc agauccauag guuugcacc acaccaaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220
 ucguucugcg uugggcuuua uuccuaugcu gucggguccc agcuucccug ugaaccugag 8280
 cccgacgcag acguauugag guccaugcu acagaucgc cccacaucaac ggcggagacu 8340
 gcggcgcggc gcuuggcacg gggaucaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacguggac 8460
 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
 gugcccguuc uggacuucu cgagccaug gccgaggaag agagcgaccu ugagccuca 8580
 auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuuacc ggcuugggca 8640
 cggccugacu acaaccgcc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgcc 8700
 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760
 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggu gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgcc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac guccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagauccgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcucccg guucgggcuc ggggucuugg 9060
 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucaua cuccuggacc 9120
 ggggcucuaa uaacucccug uagccccgaa gaggaaaagu ugccaaucaa ccuuugagu 9180
 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaagag cgccucacag 9240
 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caagugcucg acgcccauua ugacucaguc 9300
 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgcaa ggcuccucac cuuggaggag 9360
 gcgugccagu ugacuccacc ccauucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucaagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 gaagaccac aaacaccaau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540

gaccccgcca aggggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaccuga ccucggcguc 9600
 cgggucugcg agaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660
 ggagcuuccu auggcuucca guacucuccu gcccacggg uggaguaucu cuugaaagca 9720
 ugggcggaaa agaaggacc cauggguuuu ucguaugaua cccgaugcuu cgacucaacc 9780
 gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggccugcuc ccugcccag 9840
 gagggccgca cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccanguuc 9900
 aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
 agcaugggua acaccaucac augcuauug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
 auaguugcgc ccacaaugcu gguaugcggc gaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg aggccaugac cagguacucu 10140
 gcccuccug gugaucuccc cagaccggaa uaugaccugg agcuauaac auccuguucc 10200
 ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgcg ggccgcccga gauacuaccu gaccagagac 10260
 ccaaccacuc cacucgccc ggcugccugg gaaacaguua gacacuccc uaucaauuca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaugcuca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 cacuucuucu ccuuucucu gguccaagac acccuggacc agaaccucaa cuuugagaug 10440
 uauggaucag uauacuccgu gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
 gggcuugacg ccuuuucua gacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560
 gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
 agggcguccc ucaucucccg uggagggaaa gcggccguuu gcgccgaua ucucucaau 10680
 ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccuuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cgccggcggg ggcgacauuu uucacagcgu gucgcgcgcc 10800
 cgaccccgcu cauuacucuu cgcccuacuc cuacuuuucg uaggggguagg ccucuuccua 10860
 cuccccgcuc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuuu 10920
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucccucuuu 10980
 cuucccuucu caucuauuc uacuucuuu cuugguggc ccaucuagc ccuagucag 11040
 gcuagcugug aaagguccgu gagccgcaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
 gcagaucaug u 11111

<210> 14

<211> 11111

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

<400> 14

```

accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc c uccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg a auugccggg 180
aagacugggu ccuuucuugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg c gugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug c cugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca a uccuaaacc 360
ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg ucgccc aaug auugaacaag a uggauugca 420
cgcagguucu ccggccgcuu ggguggagag gcuaauucggc uaugacuggg c acaacagac 480
aaucggcugc ucugaugccg ccguguuccg gcugucagcg caggggcgcc c gguucuuuu 540
ugucaagacc gaccuguccg gugcccugaa ugaacugcag gacgaggcag c gcggcuauc 600
guggcuggcc acgacgggcg uuccuugcgc agcugugcuc gacguuguca c ugaagcggg 660
aaggacugg cugcuauugg gcgaagugcc ggggcaggau cuccugucau c ucaccuugc 720
uccugccgag aaaguaucca ucauggcuga ugcaaugcgg cggcugcaua c gcuugaucc 780
ggcuaccugc ccuucgacc accaagcgaa acaucgcauc gagcgagcac guacucggau 840
ggaagccggg cuugucgauc aggaugaucu ggacgaagag caucaggggc ucgcgccagc 900
cgaacuguuc gccaggcuca aggcgcgc au gcccgcggc gaggaucucg ucgugaccca 960
uggcgaugcc ugcuugccga auaucauggu ggaaaauggc cgcuuuucug g auucaucga 1020
cuguggccgg cugggugugg cggaccgcua ucaggacaua gcguuggcua c ccgugauau 1080

```


ugcugaagag cuuggcggcg aaugggcuga ccgcuuccuc gugcuuuacg guaucgccgc 1140
 ucccgauucg cagcgcaucg ccuucuaucg ccuucuugac gaguucuucu gaguuuaaac 1200
 ccucucccuc ccccccccu aacguuacug gccgaagccg cuuggaauaa ggccggugug 1260
 cguuugucua uauguuauuu uccaccauau ugccgucuuu uggcaaugug agggcccgga 1320
 aaccuggccc ugucuucuug acgagcauuc cuaggggucu uuccccucuc gccaaaggaa 1380
 ugcaaggucu guugaauguc gugaaggaag caguuccucu ggaagcuucu ugaagacaaa 1440
 caacgucugu agcgaccuu ugcaggcagc ggaaccccc accuggcgac aggugccucu 1500
 gcggccaaaa gccacgugua uaagauacac cugcaaaggc ggcacaacc cagugccacg 1560
 uuugagauug gauaguugug gaaagaguca aauggcucuc cucaagcgua uucaacaagg 1620
 ggcugaagga ugcccagaag guaccccauu guaugggauc ugaucugggg ccucggugca 1680
 caugcuuuac auguguuuag ucgagguuaa aaaaacgucu agggcccccg aaccacgggg 1740
 acgugguuuu ccuuugaaaa acacgaugau accaugagca caaauccuaa accucaaaga 1800
 aaaacaaaaa gaaacaccaa ccgucgcca gaagacguua aguucccggg cggcggccag 1860
 aucguuggcg gaguauacuu guugccgcgc aggggccccca gguugggugu gcgcacgaca 1920
 aggaaaacuu cggagcgguc ccagccacgu gggagacgcc agcccauccc caaagaucgg 1980
 cgcuccacug gcaaggccug gggaaaacca ggucgccccu ggccccuaua ugggaaugag 2040
 ggacucggcu gggcaggaug gcuccugucc ccccgaggcu cucgccccuc cuggggcccc 2100
 acugaccccc ggcauagguc gcgcaacgug gguaaaguca ucgacaccu aacguguggc 2160
 uuugccgacc ucauggggua cauccccguc guaggcgccc cgcuuagugg cgccgccaga 2220
 gcugucgcgc acggcgugag aguccuggag gacggggua auaugcaac agggaaccua 2280
 cccgguuucc ccuuuucua cuucuugcug gcccuuguu ccugcaucac cguuccgguc 2340
 ucugcugccc aggugaagaa uaccaguagc agcuacaugg ugaccauga cugcuccaau 2400
 gacagcauca cuuggcagcu cgaggcugcg guucccacg uccccgggug cgucccguc 2460
 gagagagugg ggaauacguc acgguguugg gugccagucu cgccaaacau ggcugugcgg 2520
 cagcccggug ccucacgca gggucugcgg acgcacauc auaugguugu gauguccgcc 2580
 accuucugcu cugcucucua cgugggggac cucuguggcg gggugaugcu cgcggccag 2640
 guguucaucg ucucgccga guaccacugg uuugugcaag aaugcaauug cuccaucua 2700
 ccuggcacca ucacuggaca ccgcauggca ugggacauga ugaugaacug gucgcccacg 2760
 gccaccauga uccuggcgua cgugaugcgc guccccgagg ucaucauaga caucguuagc 2820

ggggcucacu ggggcgucau guucggcuug gccuacuucu cuaugcaggg agcgugggcg 2880
 aaggucauug ucauccuucu gcuggccgcg gggguggacg cgggcaccac caccguugga 2940
 ggcgcuguug cacguuccac caacgugauu gccggcgugu ucagccaugg cccucagcag 3000
 aacauucagc ucauuacac caacggcagu uggcacauca accguacugc cuugaauugc 3060
 aaugacuccu ugaacaccgg cuuucucgcg gccuuguucu acaccaaccg cuuuaacucg 3120
 ucaggguugc cagggcgccu guccgccugc cgcaacaucg aggcuuuccg gauaggguug 3180
 ggcacccuac aguacgagga uaaugucacc aauccagagg auaugaggcc guacugcugg 3240
 cacuaccccc caaagccgug uggcguaguc cccgcgaggu cugugugugg cccaguguac 3300
 uguuucaccc ccagcccggg aguagugggc acgaccgaca gacguggagu gccaccuac 3360
 acauggggag agaaugagac agaugucuuc cuacugaaca gcacccgacc gccgcagggc 3420
 ucaugguucg gcugcacgug gaugaacucc acugguuua ccaagacuug uggcgcgcca 3480
 ccuugccgca ccagagcuga cuucaacgcc agcacggacu uguugugccc uacggauugu 3540
 uuuaggaagc auccugaugc cacuuauauu aagugugguu cugggcccug gcucacacca 3600
 aagugccugg uccacuaccc uuacagacuc uggcuuuacc ccugcacagu caauuuuacc 3660
 aucuucaaga uaagaaugua uguagggggg guugagcaca ggcucacggc cgcaugcaac 3720
 uucacucgug gggauccgug cgacuuggag gacagggaca ggagucagcu gucuccucug 3780
 uugcacucua ccacggaug ggccauccug ccugcaccu acucagacuu acccgcuug 3840
 ucaacugguc uucuccaccu ucaccagaac aucguggacg uacaauacau guauggccuc 3900
 ucaccugcua ucacaaaaua cgucguucga ugaggaguggg ugguacucuu auuccugcuc 3960
 uuagcggacg ccagagucug cgccugcuug uggaugcuca ucuuguuggg ccaggccgaa 4020
 gcagcauugg agaaguuggu cgucuugcac gcugcgagug cggcuaacug ccauggccuc 4080
 cuauauuuug ccaucuucuu cguggcagcu uggcacauca ggggucgggu ggucuccuug 4140
 accaccuauu gccucacugg ccuauggccc uucugccuac ugcucauggc acugccccgg 4200
 caggcuuaug ccuaugacgc accugugcac ggacagauag gcguggguuu guugauauug 4260
 aucaccucu ucacacucac cccggggauu aagaccucc ucggccagug ucuguggugg 4320
 uugugcuauc uccugacccu gggggaagcc augauucagg aguggguacc acccaugcag 4380
 gugcgcggcg gccgcgaugg caucgcgugg gccgucacua uauucugccc ggguguggug 4440
 uuugacauua ccaaauggcu uuuggcguug cuugggccug cuuaccucu aagggccgcg 4500
 uugacacaug ugccguacuu cgucagagcu cacgcucuga uaaggguaug cgcuuuggug 4560

aagcagcucg cgggggguag guauguucag guggcgcuau uggcccuugg cagguggacu 4620
ggcaccuaca ucuauacca ccucacaccu augucggacu gggccgcuag cggccugcgc 4680
gacuuagcgg ucgccgugga acccaucauc uucaguccga uggagaagaa ggucaucguc 4740
uggggagcgg agacggcugc auguggggac auucuacaug gacuucccg uuccgcccga 4800
cucggccagg agauccuccu cggcccagcu gauggcuaca ccuccaaggg guggaagcuc 4860
cuugcuccca ucacugcuua ugcccagcaa acacgaggcc uccugggcgc cauaguggug 4920
aguaugacgg ggcgugacag gacagaacag gccggggaag uccaaauccu guccacaguc 4980
ucucaguccu uccucggaac aaccaucucg gggguuuugu ggacuguuua ccacggagcu 5040
ggcaacaaga cucuagccgg cuuacggggu ccggucacgc agauguacuc gagugcugag 5100
ggggacuugg uaggcuggcc cagccccccu gggaccaagu cuuuggagcc gugcaagugu 5160
ggagccgucg accuauaucu ggucacgcgg aacgcugaug ucaucccggc ucgagacgc 5220
ggggacaagc ggggagcauu gcucuccccg agacccauuu cgaccuugaa gggguccucg 5280
ggggggccgg ugcucugccc uagggggccac gucguugggc ucuuccgagc agcugugugc 5340
ucucggggcg uggccaaauc caucgauuuc auccccguug agacacucga cguuguuaca 5400
aggucuccca cuuucaguga caacagcacg ccaccggcug ugccccagac cuaucagguc 5460
ggguacuugc augcuccaac uggcagugga aagagcacca aggucccugu cgcguaugcc 5520
gcccaggggu acaaaguacu agugcuuaac ccucgguag cugccaccu gggguuuggg 5580
gcuuaccuau ccaaggcaca uggcaucaau cccaacauua ggacuggagu caggaccgug 5640
augaccgggg aggccaucac guacuccaca uauggcaau uucucgccga ugggggcugc 5700
gcuagcggcg ccuaugacau caucauugc gaugaaugcc acgcugugga ugcuaaccucc 5760
auucucggca ucggaacggu ccuugaucua gcagagacag ccggggucag acuaacugug 5820
cuggcuacgg ccacaccccc cgggucagug acaaccccc aucccgauau agaagaggua 5880
ggccucgggc gggaggguga gaucuccuuc uaugggaggg cgauuccccu auccugcauc 5940
aagggaggga gacaccugau uuucugccac ucaaagaaaa agugugacga gcucgcggcg 6000
gcccucggg gcaugggcuu gaugccgug gcauacuaua gagggguugga cgucuccaua 6060
auaccagcuc agggagaugu gguggucguc gccaccgacg ccuucaugac gggguacacu 6120
ggagacuug acuccgugau cgacugcaau guagcgguca cccaagcugu cgacuucagc 6180
cuggacccca ccuucacuau aaccacacag acugucccac aagacgcugu cucacgcagu 6240
cagcgccgcg ggcgcacagg uagaggaaga cagggcacuu auagguaugu uuccacuggu 6300

gaacgagccu caggaauguu ugacagugua gugcuuugug agugcuacga cgcaggggcu 6360
 gcgugguacg aucucacacc agcggagacc accgucaggc uuagagcgua uuucaacacg 6420
 cccggccuac ccguguguca agaccaucuu gaauuuuggg aggcaguuuu caccggccuc 6480
 acacacauag acgcccacuu ccucucccaa acaaagcaag cgggggagaa cuucgcguac 6540
 cuaguagccu accaagcuac ggugugcgcc agagccaagg cccucucccc guccugggac 6600
 gccaugugga agugccuggc ccgacucaag ccuacgcuug cgggccccac accucuccug 6660
 uaccguuugg gcccuauuac caaugagguc acccucacac acccugggac gaaguacauc 6720
 gccacaugca ugcaagcuga ccuugagguc augaccagca cguggguccu agcuggagga 6780
 guccuggcag ccgucgccgc auauugccug gcgacuggau gcguuuccau caucggccgc 6840
 uugcacguca accagcgagu cgucguugcg ccggauaagg agguccugua ugaggcuuuu 6900
 gaugagaugg aggaaugcgc cucuagggcg gcucucaucg aagaggggca gcggauagcc 6960
 gagauguuga aguccaagau ccaaggcuug cugcagcagg ccucuaagca ggcccaggac 7020
 auacaacccg cuaugcaggc uucauggccc aaaguggaac aauuuugggc cagacacaug 7080
 uggaacuuca uuagcggcau ccaauaccuc gcaggauugu caacacugcc agggaacccc 7140
 gcgguggcuu ccaugauggc auucagugcc gccucacca guccguuguc gaccaguacc 7200
 accauccuuc ucaacaucau gggaggcugg uuagcguccc agaucgcacc acccgcgggg 7260
 gccaccggcu uugucgucag uggccuggug ggggcugccg ugggcagcau aggccugggu 7320
 aaggugcugg uggacauccu ggcaggauau ggugcgggca uuucgggggc ccucgucgca 7380
 uucaagauca ugucuggcga gaagcccucu auggaagaug ucaucaaucu acugccuggg 7440
 auccugucuc cgggagcccu gguggugggg gucaucugcg cggccauucu gcgccgccac 7500
 gugggaccgg gggagggcgc gguccaugg augaacaggc uuauugccuu ugcuuccaga 7560
 ggaaaccacg ucgccccuac ucacuacgug acggagucgg augcgucgca gcgugugacc 7620
 caacuacuug gcucucuuac uauaaccagc cuacucagaa gacuccacaa uuggauaacu 7680
 gaggacugcc ccaucccaug cuccggaucc uggcuccgcg acguguggga cuggguuugc 7740
 accaucuuga cagacuucua aaauuggcug accucuaaa uguuccccaa gcugcccggc 7800
 cuccccuuca ucucuuguca aaagggguac aaggguuguu gggccggcac uggcaucaug 7860
 accacgcgcg gcccuugcgg cgccaacauc ucuggcaaug uccgccuggg cucuaugagg 7920
 aucacagggc cuaaaaccug caugaacacc uggcagggga ccuuuccuau caauugcuac 7980
 acggagggcc agugcgcgcc gaaaccccc acgaacuaca agaccgccau cuggagggug 8040

gcggccucgg aguacgcgga ggugacgcag caugggucgu acuccuaugu aacaggacug 8100
 accacugaca aucugaaaau uccuugccaa cuaccuucuc cagaguuuuu cuccugggug 8160
 gacggugugc agauccauag guuugcacc caccacaaagc cguuuuuccg ggaugagguc 8220
 ucguucugcg uugggcuuaa uuccuaugcu gucggguccc agcuucccug ugaaccugag 8280
 cccgacgcag acguauugag guccaugcua acagaucgc cccacaucac ggcggagacu 8340
 gcggcgcggc gcuuggcacg gggaucaccu ccaucugagg cgagcuccuc agugagccag 8400
 cuaucagcac cgucgcugcg ggccaccugc accaccaca gcaacaccua ugacguggac 8460
 auggucgaug ccaaccugcu cauggagggc gguguggcuc agacagagcc ugaguccagg 8520
 gugcccguuc uggacuuccu cgagccaug gccgaggaag agagcgaccu ugagcccuca 8580
 auaccaucgg agugcaugcu ccccaggagc ggguuuccac gggccuucc ggcuugggca 8640
 cggccugacu acaaccgcc gcucguggaa ucguggagga ggccagauua ccaaccgccc 8700
 accguugcug guugugcucu ccccccccc aagaaggccc cgacgccucc cccaaggaga 8760
 cgccggacag ugggucugag cgagagcacc auaucagaag ccuccagca acuggccauc 8820
 aagaccuuug gccagcccc cucgagcggu gaugcaggcu cguccacggg ggcgggcgcc 8880
 gccgaauccg gcgguccgac guccccuggu gagccggccc ccucagagac agguuccgcc 8940
 uccucuaugc cccccucga gggggagccu ggagaucgg accuggaguc ugaucaggua 9000
 gagcuucaac cucccccca gggggggggg guagcucccg guucgggcuc ggggucuugg 9060
 ucuacuugcu ccgaggagga cgauaccacc gugugcugcu ccaugucaua cuccuggacc 9120
 ggggcucuaa uaacucccug uagccccgaa gaggaaaagu ugccaaucaa cccuuugagu 9180
 aacucgcugu ugcgauacca uaacaaggug uacuguacaa caucaagag cgccucacag 9240
 agggcuaaaa agguaacuuu ugacaggacg caagugcucg acgcccuaa ugacucaguc 9300
 uuaaaggaca ucaagcuagc ggcuuccaag gucagcgcaa ggcuccucac cuuggaggag 9360
 gcgugccagu ugacuccacc ccauucugca agauccaagu auggauucgg ggccaaggag 9420
 guccgcagcu uguccgggag ggccguuaac cacaucagu ccguguggaa ggaccuccug 9480
 gaagaccac aaacaccaau ucccacaacc aucauggcca aaaaugaggu guucugcgug 9540
 gaccccgcca agggggguua gaaaccagcu cgccucaucg uuuaaccuga ccucggcguc 9600
 cgggucugcg agaaaauggc ccucuaugac auuacacaaa agcuuccuca ggcgguaaug 9660
 ggagcuuccu auggcuuca guacucccu gcccaacggg uggaguaucu cuugaaagca 9720
 ugggcggaaa agaaggacc cauggguuuu ucguaugaua cccgaugcuu cgacucaacc 9780

gucacugaga gagacaucag gaccgaggag uccauauacc aggccugcuc ccugcccagag 9840
 gaggcccgcg cugccauaca cucgcugacu gagagacuuu acguaggagg gcccanguuc 9900
 aacagcaagg gucaaaccug cgguuacaga cguugccgcg ccagcggggu gcuaaccacu 9960
 agcaugggua acaccaucac augcuauugug aaagcccuag cggccugcaa ggcugcgggg 10020
 auaguugcgc ccacaaugcu gguaugcggc aaugaccuag uagucaucuc agaaagccag 10080
 gggacugagg aggacgagcg gaaccugaga gccuucacgg aggccaugac cagguacucu 10140
 gcccuccug gugaucuccc cagaccggaa uaugaccugg agcuauaac auccuguucc 10200
 ucaaaugugu cuguggcguu gggcccgcgg ggccgccgca gauacuaccu gaccagagac 10260
 ccaaccacuc cacucgcccg ggcugccugg gaaacaguua gacacuccc uaucaauuca 10320
 uggcugggaa acaucaucca guaугcucca accauauggg uucgcauggu ccuaaugaca 10380
 cacuucuucu ccuucucuu gguccaagac acccuggacc agaaccucaa cuuugagaug 10440
 uauggaucag uauacuccgu gaauccuuug gaccuuccag ccuaauuga gagguuacac 10500
 gggcuugacg ccuuuucuuu gcacacauac ucucaccacg aacugacgcg gguggcuuca 10560
 gccucagaa aacuuggggc gccaccccuc agggugugga agagucgggc ucgcgcaguc 10620
 agggcguccc ucaucucccg uggagggaaa gcggccguuu gcggccgaua ucucuucaau 10680
 ugggcgguga agaccaagcu caaacucacu ccuugccgg aggcgcgccu acuggacuua 10740
 uccaguuggu ucaccgucgg cgccggcggg ggcgacauuu uucacagcgu gucgcgcgcc 10800
 cgaccccgcu cauucucuu cgccuacuc cuacuuuucg uagggguagg ccucuuccua 10860
 cucccccgcuc gguagagcgg cacacacuag guacacucca uagcuaacug uuccuuuuuu 10920
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucccucuuu 10980
 cuucccuucu caucuauuc uacuucuuu cuugguggc ccaucuagc ccuagucacg 11040
 gcuagcugug aaagguccgu gagccgcaug acugcagaga gugccguaac uggucucucu 11100
 gcagaucaug u 11111

<210> 15

<211> 9707

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA comprising full-length Hepatitis C virus genomic RNA derived from JFH-1 clone, wherein an amino acid motif GDD has been mutated into GND

<400> 15

```

gaauucuaau acgacucacu auagaccugc ccuaauagg ggcgacacuc cgccaugaau 60
cacuccccug ugaggaacua cugucuucac gcagaaagcg ccuagccaug gcguuaguau 120
gagugucgua cagccuccag gcccccccu cccgggagag ccuaguggu cugcggaacc 180
ggugaguaca ccggaauugc cgggaagacu ggguccuuuc uuggauaaac ccacucuaug 240
cccggccaau ugggcgugcc cccgcaagac ugcuagccga guagcguugg guugcgaaag 300
gccuuguggu acugccugau agggcgcuug cgagugcccc gggaggucuc guagaccgug 360
caccaugagc acaaauccua aaccucaaag aaaaaccaa agaaacacca accgucgcc 420
agaagacguu aaguucccg ggcggcgcca gaucguuggc ggaguauacu uguugccgcg 480
caggggcccc agguugggug ugcgcacgac aaggaaaacu ucggagcggg cccagccacg 540
ugggagacgc cagcccaucc ccaaagaucg gcgcuccacu ggcaaggccu ggggaaaacc 600
aggucgcccc uggccccuau augggaauga gggacucggc ugggcaggau ggcuccuguc 660
cccccgagge ucucgccccu ccuggggccc cacugacccc cggcauaggu cgcgcaacgu 720
ggguaaaguc aucgacaccc uaacgugugg cuuugccgac cucauggggg acauccccgu 780
cguaggcgcc ccgcuuagug gcgcccgcag agcugucgcg cacggcguga gaguccugga 840
ggacgggggu aauuaugcaa cagggaaccu acccgguuuc cccuuuucua ucuucuugcu 900
ggcccuguug uccugcauca ccguuccggg cucugcugcc caggugaaga auaccaguag 960
cagcuacaug gugaccaaug acugcuccaa ugacagcauc acuuggcagc ucgaggcugc 1020
gguucuccac guccccgggu gcgucccgug cgagagagug gggaauacgu cacgguguug 1080
ggugccaguc ucgccaacaa uggcugugcg gcagcccggg gccucacgc agggucugcg 1140
gacgcacauc gauaugguug ugauguccgc caccuucugc ucugcucucu acguggggga 1200
ccucuguggc ggggugaugc ucgcggccca gguguucauc gucucgccgc aguaccacug 1260
guuugugcaa gaaugcaau gcuccaucua ccuggcacc aucacuggac accgcauggc 1320

```

augggacaug augaugaacu ggucgcccac ggccaccaug auccuggcgu acgugaugcg 1380
cguccecgag gucaucauag acaucguuag cgggggcucac uggggcguca uguucggcuu 1440
ggccuacuuc ucuaugcagg gagcgugggc gaaggucuu gucauccuuc ugcuggccgc 1500
ugggguggac gcgggcacca ccaccguugg aggcgcuguu gcacguucca ccaacgugau 1560
ugccggcgug uucagccaug gccucagca gaacauucag cucauuuaca ccaacggcag 1620
uuggcacauc aaccguacug ccuugaauug caaugacucc uugaacaccg gcuuucucgc 1680
ggccuuguuc uacaccaacc gcuuuuacuc gucagggugu ccagggcgcc uguccgccug 1740
ccgcaacauc gaggcuuucc ggauagggug gggcacccua caguacgagg auaaugucac 1800
caauccagag gauaugaggc cguacugcug gcacuacccc ccaaagccgu guggcguagu 1860
ccccgcgagg ucugugugug gccagugua cuguuucacc cccagcccgg uaguaguggg 1920
cacgaccgac agacguggag ugcccaccua cacaugggga gagaugaga cagaugucu 1980
ccuacugaac agcaccgac cgccgcaggg cucaugguuc ggcugcacgu ggaugaacuc 2040
cacugguuuc accaagacuu guggcgccgc accuugccgc accagagcug acuucaacgc 2100
cagcacggac uuguugugcc cuacggauug uuuuaggaag cauccugaug ccacuuauau 2160
uaaguguggu ucugggccc ggucacacacc aaagugccug guccacuacc cuuacagacu 2220
cuggcauuac ccugcacag ucauuuuuac caucucaag auaagaugu auguaggggg 2280
gguugagcac aggcucacgg ccgcaugcaa cuucacucgu ggggaucgu gcgacuugga 2340
ggacagggac aggagucagc ugucuccucu guugcacucu accacggaau gggccauccu 2400
gccucgcacc uacucagacu uaccgcuuu gucaacuggu cuucuccacc uucaccagaa 2460
caucguggac guacaauaca uguauggccu cucaccugcu aucacaaaau acgucguucg 2520
augggagugg gugguacucu uauuccugcu cuuagcggac gccagagucu gcgccugcuu 2580
guggaugcuc aucuuguugg gccaggccga agcagcauug gagaaguugg ucgucuugca 2640
cgucgcgagu gcggcuaacu gccauggccu ccuauuuuu gccaucuuc ucguggcagc 2700
uuggcacauc aggggucggg ugguccecu gaccaccuau ugccucacug gccuauggcc 2760
cuucugccua cugcucaugg cacugccccg gcaggcuuau gccuauagc caccugugca 2820
cggacagaua ggcguggguu uguugauuu gaucaccuc uucacacuca ccccggggua 2880
uaagaccuc cucggccagu gucuguggug guugugcuau cuccugaccc ugggggaagc 2940
caugauucag gaguggguac caccuagca ggugcgcggc ggccgcgaug gcaucgcgug 3000
ggccgucacu auauucugcc cggguguggu guuugacauu accaaauggc uuuuggcguu 3060

gcuugggccu gcuuaccucu uaagggccgc uuugacacau gugccguacu ucgucagagc 3120
 ucacgcucug auaagggaua gcgcuuuggu gaagcagcuc gcggggggua gguauguua 3180
 gguggcgcua uuggcccuug gcagguggac uggcaccuac aucuaugacc accucacacc 3240
 uaugucggac ugggccgcua gcggccugcg cgacuuagcg gucgccgugg aacccaucau 3300
 cuucaguccg auggagaaga aggucaucgu cuggggagcg gagacggcug caugugggga 3360
 cauucuacau ggacuucccg uguccgcccg acucggccag gagauccucc ucggcccagc 3420
 ugauggcuac accuccaagg gguggaagcu ccuugcuccc aucacugcuu augcccagca 3480
 aacacgaggc cuccugggcg ccuaguggu gaguaugacg gggcgugaca ggacagaaca 3540
 ggccggggaa guccaaaucc uguccacagu cucucagucc uuccucggaa caaccaucuc 3600
 ggggguuuug uggacuguuu accacggagc uggcaacaag acucuagccg gcuuacgggg 3660
 uccggucacg cagauguacu cgagugcuga gggggacuug guaggcuggc ccagcccccc 3720
 ugggaccaag ucuuuggagc cgugcaagug uggagccguc gaccuauauc uggucacgcg 3780
 gaacgcugau gucaucccg cucggagacg cggggacaag cggggagcau ugcucucucc 3840
 gagaccuau ucgaccuuga agggguccuc gggggggccg gugcucugcc cuaggggcca 3900
 cgucguuggg cucuuccgag cagcugugug cucucggggc guggccaaau ccaucgauuu 3960
 cauccccguu gagacacucg acguuguuac aaggucuccc acuuucagug acaacagcac 4020
 gccaccggcu gugccccaga ccuaucaaggu cggguacuug caugcuccaa cuggcagugg 4080
 aaagagcacc aaggucccug ucgcguaugc cgcccagggg uacaaaguac uagugcuuaa 4140
 cccucggua gcugccaccc ugggguuugg ggcuaccua uccaaggcac auggcaucaa 4200
 ucccaacauu aggacuggag ucaggaccgu gaugaccggg gaggccauca cguacuccac 4260
 auauggcaaa uuucucgccg augggggcug cgcuagcggc gccuauaga ucaucauau 4320
 cgaugaaugc cacgcugugg augcuaccuc cauucucggc aucggaacgg uccuugauca 4380
 agcagagaca gccggggua gacuaacugu gcuggcuacg gccacacccc ccgggucagu 4440
 gacaaccccc cauuccgaua uagaagaggu aggcucggg cgggagggug agauccccc 4500
 cuaugggagg gcgauucccc uauccugcau caaggagggg agacaccuga uuuucugcca 4560
 cucaaagaaa aagugugacg agcucgcggc ggcccuucgg ggcaugggcu ugaauccgu 4620
 ggcauacuau agaggguugg acgucuccau aaauaccagcu cagggagaug ugguggucgu 4680
 cgccaccgac gcccucauga cgggguacac uggagacuuu gacuccguga ucgacugcaa 4740
 uguagcgguc acccaagcug ucgacuucag ccuggacccc accuucacua uaaccacaca 4800

gacuguccca caagacgcug ucucacgcag ucagcgccgc gggcgcacag guagaggaag 4860
acagggcacu uauagguaug uuuccacugg ugaacgagcc ucaggaaugu uugacagugu 4920
agugcuuugu gagugcuacg acgcaggggc ugcgugguac gaucucacac cagcggagac 4980
caccgucagg cuuagagcgu auuucacac gcccggccua cccguguguc aagaccaucu 5040
ugaauuuugg gaggcaguuu ucaccggccu cacacacaua gacgcccacu uccucuccca 5100
aacaagcaa gcgggggaga acuucgcgua ccuaguagcc uaccaagcua cggugugcgc 5160
cagagccaag gcccucuccc cguccuggga cgccaugugg aagugccugg cccgacucua 5220
gccuacgcuu gcggggccca caccucuccu guaccguuug ggcccuauua ccaaugaggu 5280
caccucaca caccuggga cgaaguacau cgccacaugc augcaagcug accuugaggu 5340
caugaccagc acgugggucc uagcuggagg aguccuggca gccgucgccg cauauugccu 5400
ggcgacugga ugcguuucca ucaucggccg cuugcacguc aaccagcgag ucgucguugc 5460
gccggauaag gagguccugu augaggcuuu ugaugagaug gaggaaugcg ccucuagggc 5520
ggcucucauc gaagaggggc agcggauagc cgagauguug aaguccaaga uccaaggcuu 5580
gcugcagcag gccucuaagc aggcccagga cauacaaccc gcuaugcagg cuucauggcc 5640
caaaguggaa caauuuuggg ccagacacau guggaacuuc auuagcggca uccaauaccu 5700
cgcaggauug ucaacacugc cagggaaccc cgcgguggcu uccaugaugg cauucagugc 5760
cgcccucacc aguccguugu cgaccaguac caccauccuu cucaacauca ugggaggcug 5820
guuagcgucc cagaucgcac caccgcggg ggccaccggc uuugucguca guggccuggu 5880
gggggcugcc gugggcagca uaggccuggg uaaggugcug guggacaucc uggcaggaua 5940
uggugcgggc auuucggggg cccucgucgc auucaagauc augucuggcg agaagcccuc 6000
uauggaagau gucaucaauc uacugccugg gauccugucu ccgggagccc uggugguggg 6060
ggucaucugc gcggccauuc ugcgccgcca cgugggaccg ggggaggggc cgguccaau 6120
gaugaacagg cuuauugccu uugcuuccag aggaaaccac gucgccccua cucacuacgu 6180
gacggagucg gaugcguccg agcgugugac ccaacuacuu ggcucucua cuauaaccag 6240
ccuacucaga agacuccaca auuggauaac ugaggacugc cccauccau gcuccggauc 6300
cuggcuccgc gacguguggg acuggguuug caccaucuug acagacuua aaaauuggcu 6360
gaccucuaaa uuguuccca agcugcccgg ccuccccuuc aucucuuguc aaaaggggua 6420
caagggugug ugggccggca cuggcaucau gaccacgcgc ugcccuugcg gcgccaacau 6480
cucuggcaau guccgccugg gcucuaugag gaucacaggg ccuaaaaccu gcaugaacac 6540

cuggcagggg accuuuccua ucaauugcua cacggagggc cagugcgcgc cgaaaccccc 6600
 cacgaacuac aagaccgcca ucuggaggggu ggcggccucg gaguacgcgg aggugacgca 6660
 gcaugggucg uacuccuaug uaacaggacu gaccacugac aaucugaaaa uuccuugcca 6720
 acuaccuucu ccagaguuuu ucuccugggu ggacggugug cagauccaua gguuugcacc 6780
 cacaccaag ccguuuuucc gggaugaggu cucguucugc guugggcuua auuccuaugc 6840
 ugucgggucc cagcuucccu gugaaccuga gcccgcgcga gacguauuga gguccaugcu 6900
 aacagaucgg ccccaucau cggcggagac ugcggcgcgg cgcuuggcac ggggaucacc 6960
 uccaucugag gcgagcuccu cagugagcca gcuaucagca ccgucgcugc gggccaccug 7020
 caccaccac agcaacaccu augacgugga cauggucgau gccaaccugc ucauggaggg 7080
 cgguguggcu cagacagagc cugaguccag ggugcccguu cuggacuuc ucgagccaau 7140
 ggccgaggaa gagagcgacc uugagcccuc aaauaccaucg gagugcaugc uccccaggag 7200
 cggguuucca cgggccuuac cggcuugggc acggccugac uacaaccgc cgucugugga 7260
 aucguggagg aggccagauu accaaccgcc caccguugcu gguugugcuc ucccccccc 7320
 caagaaggcc ccgacgccuc cccaaggag acgccggaca gugggucuga gcgagagcac 7380
 cauaucaaaa gccuccagc aacuggccau caagaccuuu ggccagcccc ccucgagcgg 7440
 ugaugcaggc ucguccacgg gggcgggcgc cgccgaaucc ggccguccga cgucuccug 7500
 ugagccggcc ccucagaga cagguuccgc cuccucuaug cccccccucg agggggagcc 7560
 uggagaucgg gaccuggagu cugaucaggu agagcuucaa ccucaccccc aggggggggg 7620
 gguagcuccc gguucgggcu cggggucuuu gucuacuugc uccgaggagg acgauaccac 7680
 cgugugcugc uccaugucau acuccuggac cggggcucua auaacucccu guagccccga 7740
 agaggaaaag uugccaauca acccuuugag uaacucgcug uugcgauacc auaacaaggu 7800
 guacuguaca acaucaaaaga gcgccucaca gagggcuaaa aagguaacuu uugacaggac 7860
 gcaagugcuc gacgcccauu augacucagu cuuaaaggac aucaagcuag cggcuuccaa 7920
 ggucagcgcga aggcuccuca ccuuggagga ggcgugccag uugacuccac cccauucugc 7980
 aagauccaag uauggauucg gggccaagga gguccgcagc uuguccggga gggccguuaa 8040
 ccacaucaag uccgugugga aggaccuccu ggaagacca caaacaccaa uucccacaac 8100
 caucauggcc aaaaauagag uguucugcgu ggaccccgcc aaggggggua agaaaccagc 8160
 ucgccucauc guuuaccug accucggcgu ccgggucugc gagaaaauagg cccucuauga 8220
 cauuacacaa aagcuuccuc aggcgguaau gggagcuucc uauggcuuucc aguacucucc 8280

ugcccaacgg guggaguauc ucuugaaagc augggcggaa aagaaggacc ccauggguuu 8340
 uucguaugau acccgauucu ucgacucaac cgucacugag agagacauca ggaccgagga 8400
 guccauauac caggccugcu ccugccccga ggaggcccg cugcccauac acucgcugac 8460
 ugagagacuu uacguaggag ggcccauguu caacagcaag ggucaaaccu gcgguuacag 8520
 acguugccgc gccagcgggg ugcuaaccac uagcaugggu aacaccauca caugcuaugu 8580
 gaaagcccua gcggccugca aggcugcggg gauaguugcg cccacaaucc ugguaugcgg 8640
 caaugaccua guagucaucu cagaaagcca ggggacugag gaggacgagc ggaaccugag 8700
 agccuucacg gaggccauga ccagguacuc ugccccuccu ggugaucucc ccagaccgga 8760
 auaugaccug gagcuaauaa cauccuguuc cucaaaugug ucuguggcgu ugggccccgcg 8820
 gggccgcccgc agauacuacc ugaccagaga cccaaccacu ccacucgccc gggcugccug 8880
 ggaaacaguu agacacuccc cuaucaauuc auggcuggga aacaucaucc aguaugcucc 8940
 aaccauaugg guucgcaugg uccuaaugac acacuucuc uccauucuca ugguccaaga 9000
 caccucggac cagaaccuca acuuugagau guauggauca guauacuccg ugaauccuuu 9060
 ggaccuucca gccauaaauug agagguuaca cgggcuuugac gccuuuucua ugcacacaua 9120
 cucucaccac gaacugacgc ggguggcuuc agcccucaga aaacuugggg cgccaccccu 9180
 caggguugug aagagucggg cucgcgcagu cagggcgucc cucaucuccc guggagggaa 9240
 agcggccguu ugcggccgau aucucuucua uugggcggug aagaccaagc ucaaacucac 9300
 uccauugccg gaggcgcgcc uacuggacuu auccaguugg uucaccgucg gcgccggcgg 9360
 gggcgacauu uuucacagcg ugucgcgcgc ccgaccccg ccauuacucu ucggccuacu 9420
 ccuacuucuc guagggguag gccucuuccu acuccccgc cgguagagcg gcacacacua 9480
 gguacacucc auagcuaacu guuccuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 9540
 uuuuuuuucu uuuuuuuuuu uuucccucu ucuucccuuc ucaucuuau cuacuucuu 9600
 ucuugguggc uccaucuuag ccuagucac ggcuaugcugu gaaagguccg ugagccgc au 9660
 gacugcagag agugccguaa cuggucucuc ugcagauc au gucuaga 9707

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

cgggagagcc atagtgg

17

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 17

agtaccacaa ggcctttcg

19

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

ctgcggaacc ggtgagtaca c

21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 19

aacaagatgg attgcacgca

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

cgtcaagaag gcgatagaag

20

<210> 21

<211> 11969

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/Luc

<400> 21

```
accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
aagacugggu ccuuucuugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
ucaaaagaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gaagacgcca aaaacauaaa 420
gaaaggcccg gcgccauucu auccucugga ggauggaacc gcuggagagc aacugcauaa 480
ggcuaugaag agauacgccc ugguuccugg aacaauugcu uuuacagaug cacauaucga 540
ggugaacauc acguacgcgg aauacuucga aauguccguu cgguuggcag aagcuauaag 600
acgauauggg cugaauacaa aucacagaau cgucguaugc agugaaaacu cucuucuuu 660
cuuuaugccg guguugggcg cguuauuuau cggaguugca guugcgcccc cgaacgacau 720
uuauaaugaa cgugaauugc ucaacaguau gaacauuucg cagccuaccg uaguguuugu 780
uuccaaaaag gguugcaaa aaauuuugaa cgugcaaaaa aaauuaccaa uaauccagaa 840
aaauauuauc auggauucua aaacggauua ccagggauiu cagucgaugu acacguucgu 900
cacaucucau cuaccucccg guuuuaauga auacgauuuu guaccagagu ccuuugaucg 960
ugacaaaaca auugcacuga uauagaacuc cucuggaucu acuggguuac cuaaggguu 1020
ggcccuuccg cauagaacug ccugcgucag auucucgcau gccagagauc cuauuuuugg 1080
caaucaaauc auuccggaua cugcgauuuu aaguguuguu ccauuccauc acgguuuugg 1140
aauguuuacu acacucggau auuugauaug uggauuucga gucgucuuaa uguauagauu 1200
```


ugaagaagag cuguuuuuac gaucuuuca ggauuacaaa auucaaagug cguugcuagu 1260
accaacccua uuuucauucu ugcacaaaag cacucugauu gacaaauacg auuuauaaua 1320
uuuacacgaa auugcuucug ggggcgcacc ucuuucgaaa gaagucgggg aagcggguugc 1380
aaaacgcuuc caucuuccag ggauacgaca aggauauggg cucacugaga cuacaucagc 1440
uauucugauu acacccgagg gggaugauaa accgggcgcg gucgguaaag uuguuccauu 1500
uuuugaagcg aagguugugg aucuggauac cgggaaaacg cugggcguua aucagagagg 1560
cgaauuaugu gucagaggac cuaugauuau guccgguuau guaaacaauc cggaagcgac 1620
caacgccuug auugacaagg auggauggcu acauucugga gacauagcuu acugggacga 1680
agacgaacac uucuucuuag uugaccgcuu gaagucuuua auuaaaauaca aaggauauca 1740
gguggccccc gcugaauugg aaucgauauu guuacaacac cccaacauu ucgacgcggg 1800
cguggcaggu cuucccgacg augacgccgg ugaacuuccc gccgccguug uuguuuugga 1860
gcacggaaag acgaugacgg aaaaagagau cguggauuac gucggcaguc aaguaacaac 1920
cgcgaaaaag uugcgcggag gaguuguguu uguggacgaa guaccgaaag gucuuaccgg 1980
aaaacucgac gcaagaaaaa ucagagagau ccucauaaag gccagaagg gcggaaaguc 2040
caaauuguaa guuuuaaacc ucuccucucc ccccccuua cguuacuggc cgaagccgcu 2100
uggaauaagg ccggugugcg uuugucuaua uguuauuuuc caccuauuug ccgucuuuug 2160
gcaaugugag ggcccggaaa ccuggcccug ucuucuuugac gagcauuccu aggggucuuu 2220
ccccucucgc caaaggaaug caaggucugu ugaaugucgu gaaggaagca guuccucugg 2280
aagcuucuug aagacaaaca acgucuguag cgaccuuug caggcagcgg aacccccac 2340
cuggcgacag gugccucugc ggccaaaagc cacguguaua agauacaccu gcaaaggcgg 2400
cacaacccca gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagagucaaa uggcucuccu 2460
caagcguauu caacaagggg cugaaggau cccagaaggu accccauugu augggauug 2520
aucuggggcc ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuaaaa aaacgucuag 2580
gccccccgaa ccacggggac gugguuuucc uuugaaaaac acgaugauac caugagcaca 2640
aauccuaaac cucaaagaaa aacccaaaaga aacaccaacc gucggccaga agacguuaag 2700
uucccgggcg gcggccagau cguuggcgga guauacuugu ugccgcgcag gggccccagg 2760
uugggugugc gcacgacaag gaaaacuucg gagcgguccc agccacgugg gagacgccag 2820
cccaucccca aagaucggcg cuccacuggc aaggccuggg gaaaaccagg ucgccccugg 2880
cccuauaug ggaaugaggg acucggcugg gcaggauagg uccugucccc ccgaggcucu 2940

cgccccuccu ggggccccac ugacccccgg cauaggucgc gcaacguggg uaaagucauc 3000
gacacccuaa cguguggcuu ugccgaccuc augggguaca uccccgucgu aggcgccccg 3060
cuuaguggcg ccgccagagc ugucgcgcac ggcgugagag uccuggagga cgggguuauu 3120
uaugcaacag ggaaccuacc cgguuucccc uuuucuauc ucuugcuggc ccuguugucc 3180
ugcaucaccg uuccggucuc ugcugcccag gugaagaaua ccaguagcag cuacauggug 3240
accaaugacu gcuccaauga cagcaucacu uggcagcucg aggcugcggu ucuccacguc 3300
cccgggugcg uccccgucga gagagugggg aaucagucac gguguugggu gccagucucg 3360
ccaaacaugg cugugcggca gcccggugcc cucacgcagg gucugcggac gcacaucgau 3420
augguuguga uguccgccac cuucugcucu gcucucuacg ugggggaccu cuguggcggg 3480
gugaugcucg cggcccaggu guucaucguc ucgccgcagu accacugguu ugugcaagaa 3540
ugcaauugcu ccaucuaccc uggcaccauc acuggacacc gcauggcaug ggacaugaug 3600
augaacuggu cgcaccggc caccaugauc cuggcguacg ugaugcgcgu ccccgagguc 3660
aucauagaca ucguuagcgg ggcucacugg ggcgucaugu ucggcuuggc cuacuucucu 3720
augcaggag cgugggcgaa ggucuuuguc auccuucugc ugcccgucg gguggacgcg 3780
ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 3840
agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucac 3900
cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucua 3960
accaaccgc uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 4020
gcuuuccgga uagggugggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 4080
augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 4140
guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccggugag uagugggcac gaccgacaga 4200
cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 4260
accgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 4320
aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 4380
uugugcccu cggauuguuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauauuaa gugugguucu 4440
gggcccuggc ucacaccaa gugccugguc cacuaccuu acagacucug gcauuacccc 4500
ugcacaguca auuuuaccu cuucaagaua agaauguug uaggggggggu ugagcacagg 4560
cucacggccg caugcaacu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga caggacagg 4620
agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggauggg ccauccugcc cugcaccuac 4680

ucagacuuac ccgcuuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 4740
caauacaugu auggccucuc accugcuauc acaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 4800
guacucuuau uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 4860
uuguugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 4920
gcuaacugcc auggccuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 4980
ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggcccuu cugccuacug 5040
cucauggcac ugccccggca ggcuuaugcc uaugacgcac cugugcacgg acagauaggc 5100
guggguuugu ugauauugau caccucucuc acacucaccc cgggguaaua gaccucucuc 5160
ggccaguguc uguggugguu gugcuaucuc cugaccucgg gggaagccau gauucaggag 5220
uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua 5280
uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc aaauuggcuu uggcguugcu ugggccugcu 5340
uaccucuuuaa gggccgcuu gacacaugug ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua 5400
aggguaugcg cuuuggugaa gcagcucgcg ggggguaaggu auguucaggu ggcgcuauug 5460
gcccuuggca gguggacugg caccuacauc uaugaccacc ucacaccuau gucggacugg 5520
gccgcuagcg gccugcgca cuuagcgguc gccguggaac ccaucaucuu caguccgaug 5580
gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag acggcugcau guggggacau ucuacaugga 5640
cuucccgugu ccgcccgauc cggccaggag auccuccucg gccagcuga ugguacacc 5700
uccaaggggu ggaagcuccu ugcucccauc acugcuuaug cccagcaaac acgaggccuc 5760
cugggcgcca uaguggugag uaugacgggg cgugacagga cagaacaggc cggggaaguc 5820
caauuccugu ccacagucuc ucaguccuuc cucggaacaa ccaucucggg gguuuugugg 5880
acuguuuacc acggagcugg caacaagacu cuagccggcu uacggggucc ggucacgcag 5940
auguacucga gugcugaggg ggacuuggua ggucggccca gccccccugg gaccaagucu 6000
uuggagccgu gcaagugugg agccgucgac cuauaucugg ucacgcggaa cgcugauguc 6060
aucccggcuc ggagacgcgg ggacaagcgg ggagcauugc ucuccccgag acccauuucg 6120
accuugaagg gguccucggg ggggccggug cucugcccuu ggggccacgu cguugggcuc 6180
uuccgagcag cugugugcuc ucggggcgug gccaaaucca ucgauuucau ccccgugag 6240
acacucgacg uuguuacaag gucuccacu uucagugaca acagcacgcc accggcugug 6300
ccccagaccu aucaggucgg guacuugcau gcuccaacug gcaguggaaa gagcaccaag 6360
guccucuguc cguaugccgc ccagggguaa aaaguacuag ugcuaaacc cucgguagcu 6420

gccacccugg gguuuggggc guaccuaucc aaggcacaug gcaucaaucc caacauuagg 6480
acuggagauca ggaccgugau gaccggggag gccaucacgu acuccacaua uggcaaaauu 6540
cucgccgaug ggggcugcgc uagcggcgcc uaugacauca ucauauugcg ugaauugccac 6600
gcuguggaug cuaccuccau ucucggcauc ggaacggucc uugaucaagc agagacagcc 6660
ggggucagac uaacugugcu ggcuacggcc acaccccccg ggucagugac aaccccccau 6720
cccgauauag aagagguagg ccucggggcg gagggugaga ucccuucua ugggagggcg 6780
auuccccuau ccugcaucaa gggagggaga caccugauuu ucugccacuc aaagaaaaag 6840
ugugacgagc ucgcggcggc ccuucggggc augggcuuga augccguggc auacuauaga 6900
ggguuggacg ucuccauaau accagcucag ggagaugugg uggucgucgc caccgacgcc 6960
cucaugacgg gguacacugg agacuugac uccgugaucg acugcaaugu agcggucacc 7020
caagcugucg acuucagccu ggaccccacc uucacuauaa ccacacagac uguccacaa 7080
gacgcugucu cacgcaguca gcgccgcggg cgcacaggua gaggaagaca gggcacuuau 7140
agguauguuu ccacugguga acgagccuca ggaauguuug acaguguagu gcuuugugag 7200
ugcuacgacg caggggcugc gugguacgau cucacaccag cggagaccac cgucaggcuu 7260
agagcguauu ucaacacgcc cggccuaccc gugugucaag accaucuuga auuuugggag 7320
gcaguuuuca ccggccucac acacauagac gcccacuucc ucuccaaac aaagcaagcg 7380
ggggagaacu ucgcguaccu aguagccuac caagcuacgg ugugcgccag agccaaggcc 7440
ccuccccccgu ccugggacgc cauguggaag ugccuggccc gacucaagcc uacgcuugcg 7500
ggccccacac cucuccugua ccguuugggc ccuauuacca augaggucac ccucacacac 7560
ccugggacga aguacaucgc cacaugcaug caagcugacc uugaggucan gaccagcacg 7620
uggguccuag cuggaggagu ccuggcagcc gucgccgcau auugccuggc gacuggaugc 7680
guuuccauca ucggccgcuu gcacgucaac cagcgagucg ucguugcgcc ggauaaggag 7740
guccuguaug aggcuuuuga ugagauggag gaaugcgccu cuagggcggc ucucaucgaa 7800
gaggggcagc ggauagccga gauguugaag uccaagauc aaggcuugcu gcagcaggcc 7860
ucuaagcagg cccaggacau acaacccgcu augcaggcuu cauggcccaa aguggaacaa 7920
uuuugggcca gacacaugug gaacuucan agcggcaucc aaauaccucg aggauuguca 7980
acacugccag ggaaccccg gcuggcuucc augauggcau ucagugccgc ccucaccagu 8040
ccguugucga ccaguaccac cauccuucuc acaucaugg gaggcugguu agcgucccag 8100
aucgcaccac ccgcgggggc caccggcuuu gucgucagug gccugguggg ggcugccgug 8160

ggcagcauag gccuggguuaa ggugcuggug gacauccugg caggauaugg ugcgggcauu 8220
 ucggggggccc ucgucgcauu caagaucaug ucuggcgaga agcccucua u ggaagauguc 8280
 aucaaucuac ugccugggau ccugucuccg ggagcccugg uggugggggu caucugcgcg 8340
 gccauucugc gccgccacgu gggaccgggg gagggcgcgg uccauggau gaacaggcuu 8400
 auugccuuug cuuccagagg aaaccacguc gcccucacuc acuacgugac ggagucggau 8460
 gcgucgcagc gugugacca acuacuuggc ucucuua u uaaccagccu acucagaaga 8520
 cuccacaauu ggauaacuga ggacugcccc auccaugcu ccggauccug gcuccgcgac 8580
 gugugggacu ggguuugcac caucuugaca gacuucaaaa auuggcugac cucuaaaauug 8640
 uucccacaagc ugcccggccu ccccuuacuc ucuugucaaa agggguacaa gggugugugg 8700
 gccggcacug gcaucaugac cacgcgcugc ccuugcggcg ccaacaucuc uggcaauguc 8760
 cgcuggggu cuaugaggau cacagggccu aaaaccugca ugaacaccug gcaggggacc 8820
 uuuccuauca auugcuacac ggaggggcag ugcgcgccga aacccccac gaacuacaag 8880
 accgccaucu ggaggguuggc ggccucggag uacgcggagg ugacgcagca ugggucguac 8940
 uccuauguaa caggacugac cacugacaau cugaaaauuc cuugccaacu accuucucca 9000
 gaguuuuucu ccugggugga cggugugcag auccauaggu uugcaccac accaaagccg 9060
 uuuuuccggg augaggucuc guucugcguu gggcuuaauu ccuaugcugu cgggucccag 9120
 cuucccugug aaccugagcc cgacgcagac guauugaggu ccaugcuaac agauccgccc 9180
 cacaucacgg cggagacugc ggcgcggcgc uuggcacggg gaucaccucc aucugaggcg 9240
 agcuccucag ugagccagcu aucagcaccg ucgcugcggg ccaccugcac caccacagc 9300
 aacaccuaug acguggacau ggucgaugcc aaccugcuca uggagggcgg uguggcucag 9360
 acagagccug aguuccagggu gcccgucug gacuuucucg agccaauggc cgaggaagag 9420
 agcgaccuug agcccucaau accaucggag ugcaugcucc ccaggagcgg guuuccacgg 9480
 gccuuaaccg cuugggcacg gccugacuac aaccgcgcgc ucguggaauc guggaggagg 9540
 ccagauuacc aaccgcccac cguugcuggu ugugcucucc cccccccaa gaaggccccg 9600
 acgccucucc caaggagacg ccggacagug ggucugagcg agagcaccu aucagaagcc 9660
 cuccagcaac uggccaucaa gaccuuuggc cagcccccu cgagcgguga ugcaggcucg 9720
 uccacggggg cgggcgcgcg cgaauccggc gguccgacgu cccugguga gccggcccc 9780
 ucagagacag guuccgccuc cucuaugccc cccucgagg gggagccugg agauccggac 9840
 cuggagucug aucagguaga gcuucaaccu cccccccagg gggggggggg agcucccggu 9900

ucgggcucgg ggucuugguc uacuugcucc gaggaggacg auaccaccgu gugcugcucc 9960
 augucauacu ccuggaccgg ggcucuaaua acucccugua gccccgaaga ggaaaaguug 10020
 ccaaucaacc cuuugaguaa cucgcuguug cgauaccuaa acaaggugua cuguacaaca 10080
 ucaaagagcg ccucacagag ggcuaaaaag guaacuuiuug acaggacgca agugcucgac 10140
 gcccauuuug acucagucuu aaaggacauc aagcuagcgg cuuccaaggu cagcgcaagg 10200
 cuccucaccu uggaggaggc gugccaguug acuccacccc auucugcaag auccaaguau 10260
 ggauucgggg ccaaggaggu ccgcagcuug uccgggaggg ccguuaacca caucaaguuc 10320
 guguggaagg accuccugga agaccacaa acaccaauuc ccacaaccuau cauggccaaa 10380
 aaugaggugu ucugcgugga ccccgccaag ggggguaaga aaccagcucg ccucaucguu 10440
 uaccuugacc ucggcguccg ggucugcgag aaaauggcc ucuauagacu uacacaaaag 10500
 cuuccucagg cgguaauggg agcuuccuau ggcuuccagu acuccccugc ccaacgggug 10560
 gaguaucucu ugaaagcaug ggcggaaaag aaggaccca ugguuuuuuc guaugauacc 10620
 cgaugcuucg acucaaccgu cacugagaga gacaucagga ccgaggaguc cauauaccag 10680
 gccugcuccc ugcccaggga ggcccgcacu gccauacacu cgcugacuga gagacuuuac 10740
 guaggagggc ccauguucaa cagcaagggu caaaccugcg guuacagacg uugccgcgcc 10800
 agcggggugc uaaccacuag cauggguaac accaucacu gcuauugua agcccuagcg 10860
 gccugcaagg cugcggggau aguugcgccc acaaugcugg uaugcggcga ugaccuagua 10920
 gucaucucag aaagccaggg gacugaggag gacgagcgga accugagagc cuucacggag 10980
 gccaugacca gguacucugc ccuccuggu gauccccca gaccggaaua ugaccuggag 11040
 cuaauaaca cuuguuccuc aaaugugucu guggcguugg gcccgcgggg ccgcccaga 11100
 uacuaccuga ccagagacc aaccacucca cucgcccggg cugccuggga aacaguuaa 11160
 cacuccccua ucaauucaug gcugggaaac aucauccagu augcuccaac cauauugguu 11220
 cgcauggucc uaaugacaca cuucuuucc auucucaugg uccaagacac ccuggaccag 11280
 aaccucaacu uugagaugua uggaucagua uacuccguga auccuuugga ccuuccagcc 11340
 auauuugaga gguuacacgg gcuugacgcc uuuucuaugc acacauacuc ucaccacgaa 11400
 cugacgcggg ugguucagc ccucagaaaa cuuggggcgc caccuccag gguguggaag 11460
 agucgggcuc gcgcagucag ggcguccuc aucucccgug gagggaaagc ggccguuugc 11520
 ggccgauauc ucuucaauug ggcggugaag accaagcuca aacucacucc auugccggag 11580
 gcgcgcucac uggacuuauc caguugguuc accgucggcg ccggcggggg cgacauuuuu 11640

cacagcgugu cgcgcgccccg accccgcuca uuacucuucg gccuacuccu acuuuucgua 11700
 gggguaggcc ucuuccuacu ccccgucggg uagagcggca cacacuaggu acacuccaua 11760
 gcuaacuguu cccuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuuuuuuuu uuuuucuuuu 11820
 uuuuuuuuuuu cccucuuucu ucccuucuca ucuuauucua cuuucuuucu ugguggcucc 11880
 aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa agguccguga gccgcaugac ugcagagagu 11940
 gccguaacug gucucucugc agaucaugu 11969

<210> 22

<211> 11969

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/Luc/GND

<400> 22

accugccccc aauaggggcg acacuccgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aauggccggg 180
 aagacugggu ccuuucuugg auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gaagacgcca aaaacauaaa 420
 gaaaggcccc gcgccauucu auccucugga ggauggaacc gcuggagagc aacugcauaa 480
 ggcuaugaag agauacgccc ugguuccugg aacaauugcu uuacagaug cacauaucga 540
 ggugaacauc acguacgcgg aaacuucga aauguccguu cgguuggcag aagcuauaaa 600
 acgauauggg cugaauacaa aucacagaau cgucguaugc agugaaaacu cucuucuuuu 660

cuuuauGCCG guguUGGgCG cguuauuuau cggaguUGCA guUGCGCCCG cgaacGACAU 720
 uuauaaUGAA cgugaauUGC ucaacAGUAU gaacauUUCG cagCCUACCG uaguguUUUGU 780
 uuccaaaaAG ggguUGCAAA aaauuuUGAA cgUGCAAAAA aaauUACCAa uaauCCAGAA 840
 aaUUauuuAUC auggauUCUA aaacGGAUUA ccagggAUUU cagUCGAUGU acacGUUCGU 900
 cacauCUCAU cuaccUCCCG guuuuaAUGA auacGAUUUU GUaccAGAGU cCUUGAUcG 960
 ugacaaaACA auUGCACUGA uaauGAACUC cucUGGAUCU acUGGGUuAC cuaagggUGU 1020
 ggCCCUUCCG cauagaACUG ccUGCGUCAG auUCUCGCAU gccagAGAUc CUauuuuUGG 1080
 caauCAAAUC auuccGGAUa cUGCGAUUUU aaguguUGUU ccauUCCAUC acggUUUUGG 1140
 aauguUUACU acacUCGGAU auuUGAUaug uggauUUCGA gUCGUCUAA uGUauAGAUU 1200
 ugaagaAGAG cuguUUUUAC GAUCCCUUCA ggauUACAAA auUCAaAGUG cGUUGCUAGU 1260
 accaaccCUA uuuUCAUUCU uCGCCAAAAG cacUCUGAUU gACAAUACG auuuAUCUAA 1320
 uuUACAGAA auUGCuuCUG gggGCGCACC uCUUUCGAAA gaagUCGGGG aagCGGUUGC 1380
 aaaacGCUUC caUCUCCAG ggauACGACA aggauaUGGG cUCACUGAGA cuacAUcAGC 1440
 uauUCUGAUU acacCCGAGG gggaUGAUAA accggGCGCG gUCGGUAAAG uUGUCCAUU 1500
 uuuUGaAGCG aagguUGUGG auCUGGAUAC cggGAAAACG cUGGGCGUUA auCAGAGAGG 1560
 cgaauUAUGU guCAGAGGAC cUAUGAUUAU guCCGGUUAU guAAACAaUC cGGAAGCGAC 1620
 caacGCCUUG auUGACAAGG auggaUGGCU acaUUCUGGA gACAUAGCUU acUGGGACGA 1680
 agacGAACAC uUCUUCAUAG uUGACCgCUU gaagUCUUUA auUAAAUACA aaggAUauCA 1740
 ggUGGCCCCC gcUGAAUUGG aaUCGAUAUU guUACAACAC cccaACAUCU uCGACGCGGG 1800
 cGUUGCAGGU CUUCCCGACG auGACGCCGG uGAACUucc gccGCCGUUG uUGUUUUGGA 1860
 gcacGGAAAG acgaUGACGG aaaaAGAGAU cGUUGAUuAC guCGCCAGUC aAGUAACAAC 1920
 cGCGAAAAAG uUGCGCGGAG gaguUGUGUU uGUGGACGAA GUaccGAAAG guCUUACCGG 1980
 aaaacUCGAC gCAAGAAAAA ucAGAGAGAU ccUCAUAAAG gccAAGAAGG gcGGAAAGUC 2040
 caaaUUGUAA guuuAAACCC UCUCccUccc cccccCUAA cGUUACUGGC cGAAGCCGCU 2100
 uGgaauAAGG ccGGUGUGCG uuUGUCUAUA uGUuauuuUC cACCAUauUG ccGUcuuuUG 2160
 gcaauGUGAG ggCCCGGAAA ccUGGCCCUG uCUUCUUGAC gagCAUuccu agggGUcuUU 2220
 cccCUcUGc caaAGGAUG caaggUCUGU uGAaugUCGU gaAGGAAGCA guuccUCUGG 2280
 aagCUUCUUG aAGACAAACA acGUcUGUAG cGACCcuUG caggCAGCGG aacccccAC 2340
 cUGGCGACAG gUGCCUCUGC ggCCAAAAGC cAGUGUAUA agAUACaccu gCAaAGGCGG 2400

cacaacccca gugccacguu gugaguugga uaguugugga aagagucaaa uggcucuccu 2460
caagcguauu caacaagggg cugaaggau cccagaaggu accccauugu augggauug 2520
aucugggggc ucggugcaca ugcuuuacau guguuuaguc gagguuaaaa aaacgucuaag 2580
gccccccgaa ccacgggggac gugguuuucc uuugaaaaac acgaugauac caugagcaca 2640
aauccuaaac cucaaagaaa aaccaaaga aacaccaacc gucgcccaga agacguuaag 2700
uucccgggcg gcggccagau cguuggcgga guauacuugu ugccgcgcag gggccccagg 2760
uugggugugc gcacgacaag gaaaacuucg gagcgguccc agccacgugg gagacgccag 2820
cccaucccca aagaucggcg cuccacuggc aaggccuggg gaaaaccagg ucgccccugg 2880
ccccuauaug ggaugaggg acucggcugg gcaggauagg uccugucucc ccgaggcucu 2940
cgccccuccu ggggccccac ugacccccgg cauaggucgc gcaacguggg uaaagucauc 3000
gacaccuaa cguguggcuu ugccgaccuc augggguaca uccccgucgu aggcgccccg 3060
cuuaguggcg ccgccagagc ugucgcgcac ggcgugagag uccuggagga cgggguuaau 3120
uangcaacag ggaaccuacc cgguuucccc uuucuauc ucuugcuggc ccuguugucc 3180
ugcaucaccg uuccggucuc ugucgccag gugaagaaua ccaguagcag cuacauggug 3240
accaaugacu gcuccaauga cagcaucacu uggcagcucg aggcugcggu ucuccacguc 3300
cccgggugcg uccccgucga gagagugggg aauacgucac gguguugggu gccagucucg 3360
ccaaacaugg cugugcggca gcccggugcc cucacgcagg gucugcggac gcacaucgau 3420
augguuguga uguccgccac cuucugcucu gcucucuacg ugggggaccu cuguggcggg 3480
gugaugcucg cggcccaggu guucaucguc ucgccgcagu accacugguu ugugcaagaa 3540
ugcaauugcu ccaucuacc uggcaccauc acuggacacc gcauggcaug ggacaugaug 3600
augaacuggu cggccacggc caccaugauc cuggcguacg ugaugcgcu ccccgagguc 3660
aucauagaca ucguuagcgg ggcucacugg ggcgucaugu ucggcuuggc cuacuucucu 3720
augcaggag cgugggcgaa ggucuuuguc auccuucugc uggccgcugg gguggacgcg 3780
ggcaccacca ccguuggagg cgcuguugca cguuccacca acgugauugc cggcguguuc 3840
agccauggcc cucagcagaa cauucagcuc auuaacacca acggcaguug gcacaucac 3900
cguacugccu ugaauugcaa ugacuccuug aacaccggcu uucucgcggc cuuguucuaac 3960
accaaccgc uuaacucguc agggugucca gggcgccugu ccgccugccg caacaucgag 4020
gcuuuccgga uaggguuggg caccuacag uacgaggaua augucaccaa uccagaggau 4080
augaggccgu acugcuggca cuacccccca aagccgugug gcguaguccc cgcgaggucu 4140

guguguggcc caguguacug uuucaccccc agcccggguag uaguggggcac gaccgacaga 4200
cguggagugc ccaccuacac auggggagag aaugagacag augucuuccu acugaacagc 4260
acccgaccgc cgcagggcuc augguucggc ugcacgugga ugaacuccac ugguuucacc 4320
aagacuugug gcgcgccacc uugccgcacc agagcugacu ucaacgccag cacggacuug 4380
uugugcccua cggauuguuu uaggaagcau ccugaugcca cuuauauuaa gugugguucu 4440
gggcccuggc ucacaccaa guggcugguc cacuaccuu acagacucug gcuuuacccc 4500
ugcacaguca auuuuaccu cuucaagaua agaauguaug uaggggggggu ugagcacagg 4560
cucacggccg caugcaacu cacucguggg gaucgcugcg acuuggagga cagggacagg 4620
agucagcugu cuccucuguu gcacucuacc acggauggg ccauccugc cugcaccuac 4680
ucagacuac ccgcuuuguc aacuggucuu cuccaccuuc accagaacau cguggacgua 4740
cauacaugu auggccucuc accugcuau acaaaauacg ucguucgaug ggagugggug 4800
guacucuau uccugcucuu agcggacgcc agagucugcg ccugcuugug gaugcucauc 4860
uuguugggcc aggccgaagc agcauuggag aaguuggucg ucuugcacgc ugcgagugcg 4920
gcuaacugcc auggccuccu auauuuugcc aucuucucg uggcagcuug gcacaucagg 4980
ggucgggugg ucccuugac caccuauugc cucacuggcc uauggccuu cugccuacug 5040
cucauggcac ugccccggca ggcuuauugc uaugacgcac cugugcacgg acagauaggc 5100
guggguuugu ugauauugau caccucucuc acacucacc cgggguaaua gaccuccuc 5160
ggccaguguc uguggugguu gugcuauuc cugaccugg gggaagccau gauucaggag 5220
uggguaccac ccaugcaggu gcgcggcggc cgcgauggca ucgcgugggc cgucacuaua 5280
uucugcccgg gugugguguu ugacauuacc aaauuggcuu uggcguugcu ugggccugcu 5340
uaccucuuaa ggcccgcuu gacacaugug ccguacuucg ucagagcuca cgcucugaua 5400
aggguauugc cuuuggugaa gcagcucgcg ggggguaugu auguucaggu ggcgcuauug 5460
gcccuuggca gguggacugg caccuacauc uaugaccacc ucacaccuau gucggacugg 5520
gccgcuagcg gccugcgca cuuagcgguc gccguggaac ccaucaucuu caguccgaug 5580
gagaagaagg ucaucgucug gggagcggag acggcugcau guggggacau ucuacaugga 5640
cuucccgugu ccgcccga cuuagcggag auccuccucg gccagcuga ugguacacc 5700
uccaaggggu ggaagcuccu ugcuccauc acugcuuau cccagcaaac acgaggccuc 5760
cugggcgcca uaguggugag uaugacgggg cgugacagga cagaacaggc cggggaaguc 5820
caaauccugu ccacagucuc ucaguccuuc cucggaacaa ccaucucggg gguuuugugg 5880

acuguuuacc acggagcugg caacaagacu cuagccggcu uacggggucc ggucacgcag 5940
 auguacucga gugcugaggg ggacuuggua ggcuggccca gccccccugg gaccaagucu 6000
 uuggagccgu gcaagugugg agccgucgac cuauaucugg ucacgcggaa cgcugauguc 6060
 aucccggcuc ggagacgcgg ggacaagcgg ggagcauugc ucuccccgag acccauuucg 6120
 accuugaagg gguccucggg ggggccggug cucugccca ggggccacgu cguugggcuc 6180
 uuccgagcag cugugugcuc ucggggcgug gccaaaacca ucgauuucau ccccgugag 6240
 acacucgacg uuguuacaag gucucccacu uucagugaca acagcacgcc accggcugug 6300
 cccagaccu aucaggucgg guacuugcau gcuccaacug gcaguggaaa gagcaccaag 6360
 gucccugucg cguaugccgc ccaggggguac aaaguacuag ugcuaaacc cucgguagcu 6420
 gccaccucgg gguuuggggc guaccuaucc aaggcacaug gcaucaaucc caacauuagg 6480
 acuggaguca ggaccgugau gaccggggag gccaucacgu acuccacaua uggcaauuu 6540
 cucgccgaug ggggcugcgc uagcggcgcc uaugacauca ucauauccga ugaaugccac 6600
 gcuguggaug cuaccuccau ucucggcauc ggaacggucc uugaucaagc agagacagcc 6660
 ggggucagac uaacugugcu ggcuacggcc acaccccccg ggucagugac aaccccccau 6720
 cccgauauag aagagguagg ccucgggcgg gagggugaga ucccuucua ugggagggcg 6780
 auuccccuau ccugcaucaa gggagggaga caccugauuu ucugccacuc aaagaaaaag 6840
 ugugacgagc ucgcggcggc ccuucggggc augggcuuga augccguggc auacuauaga 6900
 ggguuggacg ucuccauaa accagcucag ggagaugugg uggucgucgc caccgacgcc 6960
 cucaugacgg gguacacugg agacuuugac uccgugaucg acugcaaugu agcggucacc 7020
 caagcugucg acuucagccu ggaccccacc uucacuauaa ccacacagac ugucccacaa 7080
 gacgcugucu cacgcaguca gcgccgcggg cgcacaggua gaggaagaca gggcacuuau 7140
 agguauguuu ccacugguga acgagccuca ggaauguuug acaguguagu gcuuugugag 7200
 ugcuaacgacg caggggcugc gugguacgau cucacaccag cggagaccac cgucaggcuu 7260
 agagcguauu ucaacacgcc cggccuaccc gugugucaag accaucuuga auuuugggag 7320
 gcaguuuuca ccggccucac acacauagac gccacuucc ucuccaaac aaagcaagcg 7380
 ggggagaacu ucgcguaccu aguagccuac caagcuacgg ugugcgccag agccaaggcc 7440
 ccuc(cccc)gu ccuggga(c)gc cauguggaag ugccuggccc gacucaagcc uacgcuugcg 7500
 ggccccacac cucuccugua ccguuugggc ccuauuacca augaggucac ccucacacac 7560
 ccugggacga aguacau(c)gc ccaugcaug caagcugacc uugaggucan gaccagcacg 7620

uggguccuag cuggaggagu ccuggcagcc gucgccgcau auugccuggc gacuggaugc 7680
 guuuuccauca ucggccgcuu gcacgucaac cagcgagucg ucguugcgcc ggauaaggag 7740
 guccuguaug aggcuuuuga ugagauggag gaaugcgccu cuaggggcggc ucucaucgaa 7800
 gaggggcagc ggauagccga gauguugaag uccaagaucc aaggcuugcu gcagcaggcc 7860
 ucuaagcagg cccaggacau acaacccgcu augcaggcuu cauggcccaa aguggaacaa 7920
 uuuugggcca gacacaugug gaacuucuu agcggcaucc aaauaccucgc aggauuguca 7980
 acacugccag ggaaccccgcc gguggcuucc augauggcau ucagugccgc ccucaccagu 8040
 ccguugucga ccaguaccac cauccuucuc aacaucaugg gaggcugguu agcgucccag 8100
 aucgcaccac ccgcgggggc caccggcuuu gucgucagug gccugguggg gccugccgug 8160
 ggcagcauag gccuggguuaa ggugcuggug gacauccugg caggauaugg ugcgggcauu 8220
 ucggggggccc ucgucgcauu caagaucaug ucuggcgaga agcccucua u ggaagauguc 8280
 aucaaucuac ugccugggau ccugucuccg ggagcccugg uggugggggu caucugcgcg 8340
 gccauucugc gccgccacgu gggaccgggg gagggcgcg uccauggau gaacaggcuu 8400
 auugccuuug cuuccagagg aaaccacguc gcccucacuc acuacgugac ggagucggau 8460
 gcgucgcagc gugugacca acuacuuggc ucucuuaa uaaccagccu acucagaaga 8520
 cuccacaauu ggauaacuga ggacugcccc aucccaugcu ccggauccug gcuccgcgac 8580
 gugugggacu ggguuugcac caucuugaca gacuucaaaa auuggcugac cucuaaaauug 8640
 uucccagaagc ugcccggccu ccccuucauc ucuugucaaa agggguacaa gggugugugg 8700
 gccggcacug gcaucaugac cagcgcgugc ccuugcgggc ccaacaucuc uggcaauguc 8760
 cgccugggcu cuaugaggau cacagggccu aaaaccugca ugaacaccug gcaggggacc 8820
 uuuccuauca auugcuacac ggagggccag ugcgcgccga aacccccac gaacuacaag 8880
 accgccaucu ggaggguggc ggccucggag uacgcggagg ugacgcagca ugggucguac 8940
 uccuauguaa caggacugac cacugacaau cugaaaauuc cuugccaacu accuucucca 9000
 gaguuuuucu ccugggugga cggugugcag auccauaggu uugcaccac accaaagccg 9060
 uuuuuccggg augaggucuc guucugcguu gggcuuaau ccuaugcugu cgggucccag 9120
 cuucccugug aaccugagcc cgacgcagac guauugaggu ccaugcuaac agauccgccc 9180
 cacaucacgg cggagacugc ggcgcggcgc uuggcacggg gaucaccucc aucugaggcg 9240
 agcuccucag ugagccagcu aucagcaccg ucgcugcggg ccaccugcac caccacagc 9300
 aacaccuau gacuggacau ggucgaugcc aaccugcuca uggagggcgg uguggcucag 9360

acagagccug aguccagggg gcccguucug gacuuucucg agccaauggc cgaggaagag 9420
agcgaccuug agcccucaau accaucggag ugcaugcucc ccaggagcgg guuuccacgg 9480
gccuuaccgg cuugggcacg gccugacuac aacccgccgc ucguggaauc guggaggagg 9540
ccagauuacc aaccgcccac cguugcuggu ugugcucucc cccccccaa gaaggccccg 9600
acgccucucc caaggagacg ccggacagug ggucugagcg agagcaccu aucagaagcc 9660
cuccagcaac uggccaucaa gaccuuuggc cagccccccu cgagcgguga ugcaggcucg 9720
uccacggggg cgggcgccgc cgaauccggc gguccgacgu cccucgguga gccggcccc 9780
ucagagacag guuccgccuc cucuaugccc cccucgagg gggagccugg agauccggac 9840
cuggagucug aucagguaga gcuucaaccu cccccccagg gggggggggg agcucccggu 9900
ucgggcucgg ggucuugguc uacuugcucc gaggaggacg auaccaccgu gugcugcucc 9960
augucauacu ccuggaccgg ggcucuaaua acucccugua gccccgaaga ggaaaaguug 10020
ccaaucaacc cuuugaguaa cucgcuguug cgauaccaua acaaggugua cuguacaaca 10080
ucaaagagcg ccucacagag ggcuaaaaag guaacuuiuug acaggacgca agugcucgac 10140
gcccauuauug acucagucuu aaaggacauc aagcuagcgg cuuccaaggu cagcgcgaagg 10200
cuccucaccu uggaggaggc gugccaguug acuccacccc auucugcaag auccaaguau 10260
ggauucgggg ccaaggaggu ccgcagcuug uccgggaggg ccguuaacca caucaagucc 10320
guguggaagg accuccugga agaccacaa acaccaauuc ccacaaccu cauggccaaa 10380
aaugaggugu ucugcgugga ccccgccaag ggggguaaga aaccagcucg ccucaucguu 10440
uaccugacc ucggcguccg ggucugcgag aaaaugggcc ucuaugacau uacacaaaag 10500
cuuccucagg cgguaauggg agcuuccuau ggcuuccagu acuccccugc ccaacgggug 10560
gaguaucucu ugaaagcaug ggcggaaaag aaggacccca uggguuuuuc guaugauacc 10620
cgaugcuucg acucaaccgu cacugagaga gacaucagga ccgaggaguc cauauaccag 10680
gccugcuccc ugcccaggga ggcccgcacu gccauacacu cgcugacuga gagacuuuac 10740
guaggagggc ccauguucaa cagcaagggu caaaccugcg guuacagacg uugccgcgcc 10800
agcggggugc uaaccacuag cauggguaac accaucacau gcuauugaa agcccuagcg 10860
gccugcaagg cugcggggau aguugcgccc acaaugcugg uaugcggcaa ugaccuagua 10920
gucaucucag aaagccaggg gacugaggag gacgagcgga accugagagc cuucacggag 10980
gccaugacca gguacucugc cccuccuggu gaucccccca gaccggaaua ugaccuggag 11040
cuauaacaau ccuguuccuc aaauuguguc guggcguugg gcccgcgggg ccgccgcaga 11100

uacuaccuga ccagagaccc aaccacucca cucgcccggg cugccuggga aacaguuaga 11160
 cacucceccua ucaauucaug gcugggaaac aucauccagu augcucaac cauauuggguu 11220
 cgcauggucc uaaugacaca cuucuucucc auucucaugg uccaagacac ccuggaccag 11280
 aaccucaacu uugagaugua uggaucagua uacuccguga auccuuugga ccuuccagcc 11340
 auaauugaga gguuacacgg gcuugacgcc uuuucuaugc acacauacuc ucaccacgaa 11400
 cugacgcggg ugguucagc ccucagaaaa cuuggggcgc caccuccag gguguggaag 11460
 agucgggcuc gcgcagucag ggcgucccuc aucucccgug gagggaaagc ggccguuugc 11520
 ggccgauauc ucuucaauug ggcgguagaag accaagcuca aacucacucc auugccggag 11580
 gcgcgccuac uggacuuauc caguugguuc accgucggcg ccggcggggg cgacauuuuu 11640
 cacagcgugu cgcgcgcccg accccgcuca uuacucuucg gccuacuccu acuuuucgua 11700
 gggguaggcc ucuuccuacu ccccgucagg uagagcggca cacacuaggu acacuccaaua 11760
 gcuaacuguu ccuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuucuuuu 11820
 uuuuuuuuuu ccucuuuuc ucccuucuca ucuuauucua cuuucuuuc ugguggcucc 11880
 aucuuagccc uagucacggc uagcugugaa agguccguga gccgcaugac ugcagagagu 11940
 gccguaacug gucucucugc agaucaugu 11969

<210> 23

<211> 11036

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/EGFP

<400> 23

accugcccu aaauaggggc acacuccgcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120

ccccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gugagcaagg gcgaggagcu 420
 guucaccggg guggugccca uccuggucga gcuggacggc gacguaaacg gccacaaguu 480
 cagcgugucc ggcgagggcg agggcgauug caccuacggc aagcugaccc ugaaguucan 540
 cugcaccacc ggcaagcugc ccgugcccug gcccaccuc gugaccacc ugaccuacgg 600
 cgugcagugc uucagccgcu accccgacca caugaagcag cacgacuuc ucaaguccgc 660
 caugcccgaa ggcuacguc aggagcgac caucuucuc aaggacgac gcaacuacaa 720
 gaccgcgcc gagguagaug ucgagggcg caccuggug aaccgcauc agcugaagg 780
 caucgacuuc aaggaggac gcaacauc cuaggcacaag cuggaguaca acuacaacag 840
 ccacaacguc uauaucaugg ccgacaagca gaagaacggc aucaagguga acuucaagau 900
 ccgccacaac aucgaggac gcagcgugca gcucgccgac cacuaccagc agaaccacc 960
 caucggcgac ggccccgugc ugcugcccga caaccacuac cugagcacc aguccgccc 1020
 gagcaaagac cccaacgaga agcgcgauca caugguccug cuggaguucg ugaccgccc 1080
 cgggaucacu cucggcaugg acgagcugua caaguaaguu uaaaccuc cuccccccc 1140
 cccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguuu gucuauaugu 1200
 uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccugucu 1260
 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuucc cucucgcca aggaugcaa ggucuguuga 1320
 augucgugaa ggaagcaguu ccucuggaag cuucuuaga acaacaacg ucuguagcga 1380
 cccuuugcag gcagcggaac cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 1440
 guguaaaga uacaccugca aaggcggcac aacccagug ccacguugug aguuggauag 1500
 uuguggaaag agucaaugg cucuccucaa gcguauucaa caaggggcug aaggaugccc 1560
 agaagguacc ccuauugaug ggaucugauc uggggccuc gugcacaugc uuuaaugug 1620
 uuuaugcgag guuaaaaaaa cgucuaggcc cccgaacca cggggacgug guuuuccuuu 1680
 gaaaaacacg augauaccan gagcacaau ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 1740
 accaaccguc gccagaaga cguaaaguuc ccggcgggcg gccagaucgu uggcgagua 1800
 uacuuguugc cgcgcagggg cccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 1860

cggucccagc cacgugggag acgccagccc auccccaag aucggcgcuc cacuggcaag 1920
 gccuggggaa aaccaggucg cccucggccc cuauauggga augagggacu cggcugggca 1980
 ggauggcucc uguccccccg aggcucucgc ccucucuggg gcccacuga cccccggcau 2040
 agguccgcga acguggguua agucaucgac acccuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2100
 gguuacaucc ccgucguagg cgccccgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 2160
 gugagagucc uggaggacgg gguuaauuau gcaacaggga accuaccgg uuuccccuuu 2220
 ucuauucuuc ugcuggcccu guugucucgc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 2280
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 2340
 cagcucgagg cugcgguucu ccacguccc gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 2400
 acgucacggg guugggugcc agucucgcca acauggcug ugcggcagcc cggugcccuc 2460
 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 2520
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgagg cccagguguu caucgucucg 2580
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaauugc aauugcucca ucuaccucgg caccuacau 2640
 ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucgc ccacggccac caugaucug 2700
 gcguacguga ugcgcgucgc cgaggucauc auagacaucg uuagcggggc ucacuggggc 2760
 gucauguucg gcuuggccua cuucucuaug cagggagcgu gggcgaaggu cauugucauc 2820
 cuucugcugg ccgcuggggg ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 2880
 uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc cauggcccuc agcagaacau ucagcucauu 2940
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcaauga cuccuugaac 3000
 accggcuuuc ucgcggccuu guucuacacc aaccgcuuua acucgucagg guguccaggg 3060
 cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3120
 gaggauaauug ucaccaaucc agaggauaug aggccguacu gcuggcacua cccccaag 3180
 ccguguggcg uaguccccgc gaggucugug uguggcccag uguacuguuu ccccccagc 3240
 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 3300
 gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 3360
 acguggauga acuccacugg uuucaccaag acuuugggcg cgccaccuug ccgcaccaga 3420
 gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 3480
 gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccucggcuca caccaaagug ccugguccac 3540
 uaccuuuaca gacucuggca uuaccccuugc acagucauu uuaccaucuu caagauaaga 3600

auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgc au gcaacuucac ucguggggau 3660
cgcugcgacu uggaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 3720
gaaugggcca uccugcccug caccuacuca gacuuaaccg cuuugucaac uggucuucuc 3780
caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguau ggcucucacc ugcuaucaca 3840
aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauucc ugcucuua ggcagccaga 3900
gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuug uugggccagg ccgaagcagc auuggagaag 3960
uuggucgucu ugcacgcugc gagugcggu aacugccaug gccuccuaa uuuugccauc 4020
uucuucgugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4080
acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4140
gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuucaca 4200
cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 4260
accuggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcggccgc 4320
gauggcaucg cgugggccgu cacuaauuuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaccaa 4380
uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaggc cgcuuugac acaugugccg 4440
uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg guauggcgu uggugaagca gcucgcgggg 4500
gguaugguau uucagguggc gcuauuggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucau 4560
gaccaccuca caccuauugc ggacugggcc gcuagcggcc ugcgcgacuu agcggucgcc 4620
guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 4680
gcugcaugug gggacauucu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagau 4740
cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 4800
gcuuaugccc agcaaacacg aggccuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcg 4860
gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 4920
ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 4980
gccggcuuac gggguccggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5040
uggcccagcc cccugggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5100
uauugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 5160
gcauugcucu ccccgagacc cauucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 5220
ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuc cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 5280
aaauccaucg auuucacucc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccauuuc 5340

agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaccuauC agguCgggua cuugcaugcu 5400
 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcgu augccgcccA gggguacaaa 5460
 guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccugggggu uuggggcgua ccuauccaag 5520
 gcacauggca ucaaucccaa cauuaaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 5580
 aucacguacu ccacauaugg caaauuucuc gcCgaugggg gcugcgcuag cggcgccuau 5640
 gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggauGcua ccuccauucu cggcaucgga 5700
 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg guCagacuaa cugugcuggc uacggccaca 5760
 cccccgggu cagugacaac cccccaucCc gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 5820
 ggugagaucC ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 5880
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucgggggcaug 5940
 ggcuugaaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauacc agcucaggga 6000
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccCuc augacgggggu acacuggaga cuuugacucc 6060
 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccaccuuc 6120
 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 6180
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 6240
 auguuugaca guguagugcu uugugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 6300
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuuca acacgcccgg ccuacccgug 6360
 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 6420
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 6480
 gcuacggugu gcgccagagc caaggccCcu ccccccguccu gggacgccau guggaagugc 6540
 cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 6600
 auuaccaaug agguCaccCu cacacaccCu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 6660
 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 6720
 gccgcauauu gccuggcgac uggaugcguu ucCaucaucg gccgcuugca cgucaaccag 6780
 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguauGagg cuuuugauga gauggaggaa 6840
 ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 6900
 aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuauG 6960
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7020
 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga accccgcggu ggcuuccaug 7080

auggcauuca gugccgccc caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucucaac 7140
 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccacccg cggggggccac cggcuuuguc 7200
 gucaguggcc uggugggggc ugccgugggc agcauaggcc uggguaaggu gcugguggac 7260
 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 7320
 ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuaucgc cugggauccu gucuccggga 7380
 gccucggugg ugggggucau cugcgcggcc auucugcgcc gccacguggg accgggggag 7440
 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgcc 7500
 ccuacucacu acgugacgga gucggaugcg ucgcagcgug ugacccaacu acuuggcucu 7560
 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 7620
 ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugggacuggg uuugcaccu cuugacagac 7680
 uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguu cccaagcugc ccggccuccc cuucaucucu 7740
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggcc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugcccu 7800
 ugcggcgcca acaucucugg caauguccgc cugggcucua ugaggaucau agggccuaaa 7860
 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucuuu gcuacacgga gggccagugc 7920
 gcgccgaaac cccccacgaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 7980
 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gacugaccac ugacaauucg 8040
 aaaauuccuu gccaaacuacc uucuccagag uuuuuuccu ggguggacgg ugugcagauc 8100
 cauagguuug caccacacc aaagccguu uuccgggaug agguucguu cugcguuggg 8160
 cuuaauuccu augcugucgg gucccagcuu ccugugaac cugagcccga cgcagacgua 8220
 uugaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 8280
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgucg 8340
 cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuaugacg uggacauggu cgaugccaac 8400
 cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu ccagggugcc cguucuggac 8460
 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaauacc aucggagugc 8520
 augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 8580
 ccgccgcucg uggaauugug gaggaggcca gauuaccaac cggccaccgu ugcugguugu 8640
 gcucucuccc cccccaagaa ggccccgacg ccucucccaa ggagacgccg gacagugggu 8700
 cugagcgaga gcaccuauuc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 8760
 cccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggggcg gcgccgccga auccggcggu 8820

ccgacguccc cuggugagcc ggcccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugcccccc 8880
cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 8940
ccccaggggg gggggguagc ucccggguucg ggcucggggg cuuggucuac uugcuccgag 9000
gaggacgaua ccaccgugug cugcuccaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9060
cccuguagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9120
uaccauaaca agguguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 9180
acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaucaag 9240
cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 9300
ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 9360
gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 9420
ccaauuccca caaccauau ggccaaaaau gagguguucu gcguggacc cccaagggg 9480
gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 9540
auggcccucu augacauuac acaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 9600
uuccaguacu ccccgccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 9660
gacccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcuuugacu caaccguac ugagagagac 9720
aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcucccugc ccgaggaggc ccgcacugcc 9780
auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggagggccca uguucaacag caagggucaa 9840
accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 9900
aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 9960
augcugguau gcggcgauga ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10020
gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10080
ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacauccu guuccucaa ugugucugug 10140
gcguugggcc cgcggggccg ccgcagauac uaccugacca gagaccaac cacuccacuc 10200
gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuaauca auucauggcu gggaacauc 10260
auccaguaug cuccaaccau augguucgc augguccuaa ugacacacuu cuucccauu 10320
cucauggucc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agaungaugg aucaguauac 10380
uccgugaau c uuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 10440
ucuaugcaca cauacucuca ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 10500
ggggcgccac ccucagggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc guccucauc 10560

ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 10620
 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgc cuacugg acuaaaccag uugguucacc 10680
 gucggcgccg gcggggggcg cauuuuuac agcgugucgc gcgcccgcacc ccgcucaua 10740
 cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guaggccucu uccuacucce cgcucgguag 10800
 agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 10860
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuucc ucuuucucc cuucucaucu 10920
 uauucuaacu ucuuucugg uggcuccauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 10980
 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11036

<210> 24

<211> 11036

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/EGFP/GND

<400> 24

accugcccu aauaggggcg acacuccgcc augaauacu cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaugccggg 180
 aagacugggu ccuuucugg auaaaccac ucuaugccg gccauuugg cgugccccc 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauagg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug gugagcaagg gcgaggagcu 420
 guucaccggg guggugccca uccuggucga gcuggacggc gacguaaacg gccacaaguu 480
 cagcgugucc ggcgagggcg agggcgaugc caccuacggc aagcugaccc ugaaguucan 540

cugcaccacc ggcaagcugc ccgugcccug gcccacccuc gugaccacc ugaccuacgg 600
cgugcagugc uucagccgcu accccgacca caugaagcag cacgacuucu ucaaguccgc 660
caugcccgaa ggcuacgucc aggagcgcac caucuucuuc aaggacgacg gcaacuacaa 720
gacccgcgcc gaggugaagu ucgagggcga caccucggug aaccgcaucg agcugaaggg 780
caucgacuuc aaggaggacg gcaacaucuu ggggcacaag cuggaguaca acuacaacag 840
ccacaacguc uauaucaugg ccgacaagca gaagaacggc aucaagguga acuucaagau 900
ccgccacaac aucgaggacg gcagcgugca gcucgcccac cacuaccagc agaacacccc 960
caucggcgac ggccccgugc ugcugcccga caaccacuac cugagcacc aguccgccc 1020
gagcaaagac cccaacgaga agcgcgauca caugguccug cuggaguucg ugaccgccc 1080
cgggaucau cucggcaugg acgagcugua caaguaagu uaaaccucu cccucacccc 1140
cccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguuu gucuauaugu 1200
uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccugucu 1260
ucuugacgag cauuccuagg ggucuuucc cucucgcca aggaugcaa ggucuguuga 1320
augucgugaa ggaagcagu ccucuggaag cuucuugaag acaacaacg ucuguagcga 1380
cccuuugcag gcagcggaa cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 1440
guguauaaga uacaccugca aaggcggcac aaccccagug ccacguugug aguuggauag 1500
uuguggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauucaa caaggggcug aaggauccc 1560
agaagguacc ccuauugaug ggaucugauc uggggccucg gugcacaugc uuuacaugug 1620
uuuagucgag guuaaaaaaa cgucuaggcc ccccgaaaca cggggacgug guuuuccuuu 1680
gaaaaacacg augauaccu gagcacaau ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 1740
accaaccguc gccagaaga cguaaaguuc ccggggcgcg gccagaucgu uggcggagua 1800
uacuuguugc cgcgcagggg ccccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 1860
cggucccagc cacuggggag acgccagccc auccccaaag aucggcguc cacuggcaag 1920
gccuggggaa aaccaggucg cccucggccc cuauauggga augagggacu cggcugggca 1980
ggauggcucc ugucaccccg aggcucucgc cccuccuggg gcccacuga ccccggcau 2040
aggucgcga acguggguua agucaucgac acccuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2100
ggguacauc ccgucguagg cgcgccguu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 2160
gugagagucc uggaggacgg gguuaauuau gcaacaggga accuacccgg uuuccccuuu 2220
ucuauucuuc ugcuggcccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 2280

aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 2340
cagcucgagg cugcgguucu ccacguccec gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 2400
acgucacggu guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugcccuc 2460
acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 2520
cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgagg cccagguguu caucgucucg 2580
ccgcaguacc acugguuugu gcaagaaugc aaugcucca ucuaccucgg caccaucacu 2640
ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucgc ccacggccac caugaucug 2700
gcguacguga ugcgcgucce cgaggucauc auagacaucg uuagcggggc ucacuggggc 2760
gucauguucg gcuuggccua cuucucuaug cagggagcgu gggcgagggu cauugucauc 2820
cuucugcugg ccgcuggggg ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 2880
uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc cauggcccuc agcagaacau ucagcucuu 2940
aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcaauga cuccuugaac 3000
accggcuuuc ucgcggccuu guucuacacc aaccgcuuua acucgucagg guguccaggg 3060
cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3120
gaggauaaug ucaccaaucc agaggauaug aggccguacu gcuggcacua cccccaaag 3180
ccguguggcg uaguccecg gcaggucugug uguggcccag uguacuguuu ccccccagc 3240
ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 3300
gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 3360
acguggauga acuccacugg uuucaccaag acuuguggcg cgccaccuug ccgcaccaga 3420
gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 3480
gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccugggcuca caccaagug ccugguccac 3540
uaccuuaca gacucuggca uuaccccguc acagucuuu uuaccuucuu caagauaaga 3600
auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcac gcaacuucac ucguggggau 3660
cgcugcgacu uggaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 3720
gaaugggcca uccugcccug caccuacua gacuuaaccg cuuugucac uggucuucuc 3780
caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguaug gccucucacc ugcuaucaca 3840
aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauucc ugcucuucagc ggacgccaga 3900
gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuu uugggccagg ccgaagcagc auuggagaag 3960
uuggucgucu ugcacgcugc gagugcggu aacugccaug gccuccuua uuuugccauc 4020

uucuucgugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4080
acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4140
gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuucaca 4200
cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 4260
accugggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcggccgc 4320
gauggcaucg cgugggccgu cacuauauuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaccaa 4380
uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuaaagg cgcuuugac acaugugccg 4440
uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg guauggcguu uggugaagca gcucgcgggg 4500
gguaagguaug uucagguggc gcuaauuggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacauau 4560
gaccaccuca caccuauguc ggacugggcc gcuagcggcc ugcgcgacuu agcggucgcc 4620
guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 4680
gcugcaugug gggacauucu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 4740
cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 4800
gcuuaugccc agcaaacacg aggccuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcgu 4860
gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 4920
ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 4980
gccggcuuac gggguccggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5040
uggcccagcc cccucgggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5100
uaucugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 5160
gcauugcucu ccccgagacc cauuucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 5220
ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuc cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 5280
aaauccaucg auuucacucc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 5340
agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaccuauc aggucgggua cuugcaugcu 5400
ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcgu augccgccc a gggguacaaa 5460
guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccuggggu uuggggcgua ccuauccaag 5520
gcacauggca ucaaucccaa cauuaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 5580
aucacguacu ccacauaugg caaauuucuc gccgaugggg gcugcgcua g cggcgccuau 5640
gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggaugcua ccuccauucu cggcaucgga 5700
acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 5760

ccccccgggu cagugacaac ccccacuccc gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 5820
ggugagaucc ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 5880
cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucgggggcaug 5940
ggcuugaaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccauaauacc agcucaggga 6000
gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggg acacuggaga cuuugacucc 6060
gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga ccccaccuuc 6120
acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcggggcg 6180
acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 6240
auguuugaca guguagugcu uugugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 6300
acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuua acacgcccgg ccuacccgug 6360
ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 6420
cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 6480
gcuacggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 6540
cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 6600
auuaccaaug agguacaccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 6660
gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguucc ggcagccguc 6720
gccgcuuuu gccuggcgac uggaugcguu uccaucaucg gccgcuuuca cgucaaccag 6780
cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguaugagg cuuuugauga gauggaggaa 6840
ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 6900
aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuug 6960
caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7020
ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga acccgcggg ggcuuccaug 7080
auggcauua gugccgccc caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucuaac 7140
aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccaccg cgggggccac cggcuuuguc 7200
gucaguggcc ugguuggggc ugccgugggc agcauaggcc ugguuaaggu gcugguggac 7260
auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 7320
ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuaucg cugggauccu gucuccggga 7380
gcccuuggug ugggggucuu cugcgcggcc auucugcgcc gccacguggg accgggggag 7440
ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgcc 7500

ccuacucacu acgugacgga gucggauvcg uvcgagvcgug ugacccaacu acuuggcucu 7560
cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 7620
ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugggacuggg uuugcaccau cuugacagac 7680
uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguuc cccaagcugc ccggccuccc cuucaucucu 7740
ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggcc ggcacuggca ucaugaccac gcgcugcccu 7800
ugcggcgcca acaucucugg caauguccgc cugggcucua ugaggauac agggccuaaa 7860
accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucuuu gcuacacgga gggccagugc 7920
gcgccgaaac ccccccacgaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 7980
gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gacugaccac ugacaauvcg 8040
aaaauuccuu gccaacuacc uucuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8100
cauagguuug caccacacac aaagccguuu uuccgggaug agguvcguu cucguuggg 8160
cuuaauuccu augcugvcgg gucccagcuu ccugugaac cugagcccga cgcagacgua 8220
uugaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg agacvcggc gcggcgcuug 8280
gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgvcg 8340
cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuauvcg ugagacuggu cgaugccaac 8400
cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu ccaggguvc ccguucuggac 8460
uuucvcgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaauacc aucggagugc 8520
augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 8580
ccgccgcvcg uggaauvcgug gaggaggcca gauuaccaac cgcaccvcgu uvcugguugu 8640
gcucuccccc cccccaagaa gggcccgacg ccucccccaa ggagacgccg gacagugggu 8700
cugagcgaga gcaccuauu agaagcccuc cagcaacugg ccuaucaagac cuuuggccag 8760
ccccccvcga gcggugaugc aggcvcgucc acggggggcg gcgccgccga auccggcggu 8820
ccgacguccc cuggugagcc gggcccccua gagacagguu ccgccuccuc uaugcccccc 8880
cvcgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 8940
ccccaggggg gggggguagc ucccgguuvc ggcvcggggg cuuggucuac uugcuccgag 9000
gaggacgaua ccaccguugug cvgcuccaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9060
cccuguagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9120
uaccuauaca agguvuacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 9180
acuuuugaca ggacgcaagu gcvcgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaucaag 9240

cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 9300
ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 9360
gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 9420
ccaauuccca caaccaucau ggccaaaaau gagguuguu gcguggaccc cgccaagggg 9480
gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 9540
auggcccucu augacauuac acaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 9600
uuccaguacu cccucgcccac acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 9660
gaccccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcuuugacu caaccgucac ugagagagac 9720
aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcuccucg ccgaggaggc ccgcacugcc 9780
auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggagggccca uguucaacag caagggucac 9840
accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 9900
aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 9960
augcugguau gcggcaauga ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10020
gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugccc uccuggugau 10080
ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacaucuu guuccucaa ugugucugug 10140
gcguugggcc cgcgggggccg ccgcagauac uaccugacca gagacccaac cacuccacuc 10200
gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuaucua auucauggc ugggaaacau 10260
auccaguaug cuccaaccuu auggguucgc augguccuaa ugacacacuu cuucuccauu 10320
cucauggucc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agauguaugg aucaguauac 10380
uccgugaau c uuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 10440
ucuaugcaca cauacucua ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 10500
ggggcgccac ccucaggggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc guccuacau 10560
ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 10620
aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacugg acuuauccag uugguucacc 10680
gucggcgccg gcggggggcga cauuuuucac agcgugucgc gcgcccgacc ccgcucauu 10740
cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guaggccucu uccuacucc cgucgguag 10800
agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 10860
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuucc ucuuucucc cuucucaucu 10920
uauucuaucu ucuuucugg ugguccauu uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 10980

uccgugagcc gcaugacugc agagagu gcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11036

<210> 25

<211> 11876

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/SEAP

<400> 25

accugccccc aauaggggac acacucc gcc augaaucacu cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccccuccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aaaugccggg 180
 aagacugggu ccuuucuugg auaaacccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaaccc 360
 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug cugcugcugc ugcugcugcu 420
 gggccugagg cuacagcucu cccugggcau caucccaguu gaggaggaga acccggaacu 480
 cuggaaccgc gaggcagccg agggccuuggg ugccgccaag aagcugcagc cugcacagac 540
 agccgccaag aaccucauca ucuuccuuggg cgaugggaug ggggugucua cggugacagc 600
 ugccaggau cuaaaagggc agaagaaggaa caaacugggg ccugagauac cccugggccau 660
 ggaccgcuuc ccuaugugg cucuguccaa gacauacaau guagacaaac augugccaga 720
 caguggagcc acagccacgg ccuaccuugug cggggucaag ggcaacuucc agaccuuugg 780
 cuugagugca gccgcccgc uuaaccagug caacacgaca cgcggaacg aggucaucuc 840
 cgugaugaau cgggccaaga aagcaggga gucaguggga gugguaacca ccacacgagu 900
 gcagcacgcc ucgccagccg gcaccuacgc ccacacggug aaccgcaacu gguacucgga 960

cgccgacgug ccugccucgg cccgccagga ggggugccag gacaucgcu cgcagcucau 1020
 cuccaacaug gacauugacg ugauccuagg uggaggccga aaguacaugu uucgcauggg 1080
 aaccccagac ccugaguacc cagaugacua cagccaaggu gggaccaggc uggacggga a 1140
 gaaucuggug caggaauggc uggcgaagcg ccaggggugcc cgguaugugu ggaaccgcac 1200
 ugagcucaug caggcuuccc uggacccguc ugugacccau cucauggguc ucuuugagc c 1260
 uggagacaug aaauacgaga uccaccgaga cuccacacug gaccccuucc ugauggagau 1320
 gacagaggcu gccucgccc ugcugagcag gaacccccgc ggcuuuuucc ucuucgugga 1380
 ggguggucgc aucgaccaug gucaucauga aagcaggguu uaccgggcac ugacugaga c 1440
 gaucauguuc gacgacgcca uugagagggc gggccagcuc accagcgagg aggacacgc u 1500
 gagccucguc acugccgacc acuccacgu cuucuccuuc ggaggcuacc ccugcgagg 1560
 gagcucauc uucgggcugg cccugggcaa ggcccgggac aggaaggccu acacggucc u 1620
 ccuauacgga aacgguccag gcuauugcu caaggacggc gcccgggcgg auguuaccga 1680
 gagcgagagc gggagccccg aguaucggca gcagucagca gugccccugg acgaagaga c 1740
 ccacgcaggc gaggacgugg cgguguucgc gcgcggcccc caggcgcacc ugguuacg g 1800
 cgugcaggag cagaccuua uagcgcacgu cauggccuuc gccgccugcc uggagcccu a 1860
 caccgccugc gaccuggcgc ccccgccgg caccaccgac gccgcgcacc cggguuacu c 1920
 uagagucggg gcggccggcc gcuucgagca gacaugagu uaaaccuc cccuccccc c 1980
 ccccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguuu gucuauaugu 2040
 uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccuguc u 2100
 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuuccc cucucgcaa aggaaugcaa ggucuguuga 2160
 augucgugaa ggaagcagu ccucuggaag cuucuugaag acaaacaacg ucuguagcga 2220
 cccuuugcag gcagcggaac cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagcca c 2280
 guguaaaga uacaccugca aaggcggcac aaccccagug ccacguugug aguuggauag 2340
 uuguggaaag agucaaaugg cucuccucaa gcguauuca caaggggcug aaggaugcc c 2400
 agaagguacc ccuuguaug ggaucugauc uggggccucg gugcacaugc uuuacaugug 2460
 uuuagucgag guuaaaaaaa cgucuaggcc ccccgaacca cggggacgug guuuuccuuu 2520
 gaaaaacacg augauaccu gagcacaau ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaa c 2580
 accaaccguc gccagaaga cguaaaguuc ccgggcggcg gccagaucgu uggcgagua 2640
 uacuuguugc cgcgagggg cccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 2700

cggucccagc cacgugggag acgccagccc auccccaag aucggcgcuc cacuggcaag 2760
 gccuggggaa aaccaggucg cccucggccc cuauauggga augagggacu cggcuggggca 2820
 ggauggcucc uguccccccg aggcucucgc ccucucuggg gcccacuga ccccggcau 2880
 aggucgcgca acguggguua agucaucgac acccuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2940
 ggguacaucc ccgucguagg cgcgccgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 3000
 gugagagucc uggaggacgg gguuaauuau gcaacaggga accuacccgg uuuccccuuu 3060
 ucuaucuuu ugcuggcccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 3120
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 3180
 cagcucgagg cugcgguucu ccacgucccc gggugcgucc cgugcgagag aguggggau 3240
 acgucacggg guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugcccuc 3300
 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 3360
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgagg cccagguguu caucgucugc 3420
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaaugc aaugcucca ucuaccucgg caccuacau 3480
 ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucgc ccacggccac caugauccug 3540
 gcguacguga ugcgcgucgc cgaggucauc auagacaucg uuagcggggc ucacuggggc 3600
 gucauguucg gcuuggccua cuucucuaug cagggagcgu gggcgaaggu cauugucauc 3660
 cuucugcugg ccgcuggggg ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 3720
 uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc cauggcccuc agcagaacau ucagcucuu 3780
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcaauga cuccuugaac 3840
 accggcuuuc ucgcggccuu guucuacacc aaccgcuuua acucgucagg guguccaggg 3900
 cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3960
 gaggauaug ucaccauucc agaggauaug aggccguacu gcuggcacua cccccaag 4020
 ccguguggcg uaguccccgc gaggucugug uguggcccag uguacuguuu cacccccagc 4080
 ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 4140
 gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 4200
 acugggauga acuccacugg uuucaccaag acuuguggcg cgccaccuug ccgcaccaga 4260
 gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 4320
 gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccugggcuca caccaaagug ccugguccac 4380
 uaccuuaca gacucuggca uuaccccugc acagucauu uuaccaucuu caagauaaga 4440

auguauguag gggggguuga gcacagggcuc acggccgcgau gcaacuucac ucguggggau 4500
 cgcugcgacu uggaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 4560
 gaaugggcca uccugcccug caccuacuca gacuuacccg cuuugucaac uggucuucuc 4620
 caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguauug gccucucacc ugcuaucaca 4680
 aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauucc ugcucuuage ggacgccaga 4740
 gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuug uuggggccagg ccgaagcagc auuggagaag 4800
 uuggucgucu ugcacgcugc gagugcgguu aacugccaug gccuccuaua uuuugccauc 4860
 uucuuugugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4920
 acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4980
 gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuucaca 5040
 cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 5100
 accugggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcggccgc 5160
 gauggcaucg cgugggccgu cacuauauuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaacaaa 5220
 uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaaggg ccgcuuugac acaugugccg 5280
 uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg guaungcguu uggugaagca gcucgcgggg 5340
 gguagguaug uucagguggc gcuaauuggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucuau 5400
 gaccaccuca caccuauguc ggacugggcc gcuagcggcc ugcgcgacuu agcggucgcc 5460
 guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 5520
 gcugcaugug gggacauucu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 5580
 cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 5640
 gcuaaugccc agcaaacacg aggccuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcg 5700
 gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 5760
 ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 5820
 gccggcuuac gggguccggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5880
 ugcccagacc ccccugggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5940
 uaucugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 6000
 gcauugcucu ccccagagacc cauucgacc uugaaggggu ccucgggggg gccggugcuc 6060
 ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuc cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 6120
 aaauccaucg auuucauccc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 6180

agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaccuaua aggucgggua cuugcaugcu 6240
 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcgu augccgccc a gggguacaaa 6300
 guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccuggggg uuggggcgua ccuauccaag 6360
 gcacauggca ucaaucccaa cauuaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 6420
 aucacguacu ccacauaugg caaauuucuc gccgaugggg gcugcgcua g cggcgccuau 6480
 gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggaugcua ccuccauucu cggcaucgga 6540
 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 6600
 ccccccgggu cagugacaac ccccacucc gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 6660
 ggugagaucc ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 6720
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucggggc aug 6780
 ggcuugaaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauuacc agcucaggga 6840
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggg acacuggaga cuuugacucc 6900
 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccaccuuc 6960
 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 7020
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 7080
 auguuugaca gugugugcu uugugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 7140
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuua acacgcccgg ccuaccgug 7200
 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 7260
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 7320
 gcuacggugu gcgccagagc caaggccccc ccccguccu gggacgccau guggaagugc 7380
 cuggcccgac ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 7440
 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 7500
 gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 7560
 gccgcuaau gccuggcgac uggaugcgua uccaucaucg gccgcuugca cgucaaccag 7620
 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguauagg cuuuugauga gauggaggaa 7680
 ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 7740
 aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcu aug 7800
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7860
 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga accccgcggg ggcuuccaug 7920

auggcuuca gugccgccc caccaguccg uugucgacca gUaccaccau ccuucuaac 7980
 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccacccg cggggggccac cggcuuuguc 8040
 gucaguggcc uggugggggc ugccgugggc agcauaggcc uggguaaggu gcugguggac 8100
 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg uCgcuucaa gaucaugucu 8160
 ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuaucgc cUgggauccu gucuccggga 8220
 gccucggugg ugggggucuu cugcgcggcc auucugcgcc gCcacguggg accgggggag 8280
 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu cCagaggaaa ccacgucgcc 8340
 ccuacucacu acgugacgga gucggaugcg ucgcagcgug uGaccaacu acuuggcucu 8400
 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uAacugagga cugccccauc 8460
 ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugggacuggg uUugcaccu cuugacagac 8520
 uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguuc cccaagcugc cCggccuccc cuucaucucu 8580
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggcc ggcacuggca uCaugaccac gcgcugcccu 8640
 ugcggcgcca acaucucugg caauguccgc cugggcucua uGaggaucau agggccuaaa 8700
 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucuuu gCuacacgga gggccagucg 8760
 gcgccgaaac cccccacgaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 8820
 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gAcugaccac ugacaauucg 8880
 aaaauuccuu gccacuacc uucuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8940
 cauagguuug caccacacc aaagccguuu uuccgggaug agguucuguu cugcguuggg 9000
 cuuaauuccu augcugucgg gucccagcuu ccugugaac cUgagcccga cgcagacgua 9060
 uugaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg aGacugcggc gcggcgcuug 9120
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gCcagcuau agcaccgucg 9180
 cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuaugacg uGgacauggu cgaugccaac 9240
 cugcucaugg agggcgguu ggcucagaca gagccugagu cCagggugcc cguucuggac 9300
 uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc cCucaauacc aucggagucg 9360
 augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 9420
 ccgccgcucg uggaauucgug gaggaggcca gauuaccaac cGcccaccgu ugcugguugu 9480
 gcucucuccc cccccaagaa ggccccgacg ccucucccaa gGagacgccg gacagugggu 9540
 cugagcgaga gcaccuauuc agaagcccuc cagcaacugg cCaucaagac cuuuggccag 9600
 cccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggggcg gCgccgccga auccggcggu 9660

cccgacguccc cuggugagcc ggcccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugccccc 9720
 cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccucc 9780
 ccccaggggg gggggguagc ucccggguucg ggcucggggg cuuggucuac uugcuccgag 9840
 gaggacgaua ccaccgugug cugcuccaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9900
 ccugugagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9960
 uaccauaaca agguguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 10020
 acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaucaag 10080
 cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 10140
 ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 10200
 gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 10260
 ccaauuccca caaccauau ggccaaaaau gagguuguu gcguggacc cgccaagggg 10320
 gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 10380
 auggcccucu augacauuac aaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 10440
 uuccaguacu ccccgccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 10500
 gaccccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcuuugacu caaccgucac ugagagagac 10560
 aucaggaccg aggaguccau auaccaggcc ugcucccugc ccgaggaggc ccgcacugcc 10620
 auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggagggccca uguucaacag caagggucaa 10680
 accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 10740
 aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 10800
 augcugguau gcggcgaua ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10860
 gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10920
 cccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacaucuu guuccucaa ugugucugug 10980
 gcguugggcc cgcggggccg ccgcagauac uaccugacca gagaccaac cacuccacuc 11040
 gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuauc auucauggcu gggaacauc 11100
 auccaguaug cuccaaccau auggguucgc augguccua ugacacacuu cuucuccauu 11160
 cucauggucc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agauguauagg aucaguauac 11220
 uccgugaau c uuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggcu ugacgccuuu 11280
 ucuaugcaca cauacucuca ccacgaacug acgcgggugg cuucagcccu cagaaaacuu 11340
 ggggcgccac ccucagggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc guccucauc 11400

ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 11460
 aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacugg acuaauccag uugguucacc 11520
 gucggcgccg gcggggggcga cauuuuucac agcgugucgc gcgcccgcacc ccgcucauua 11580
 cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guaggccucu uccuacucce cgcuaggguag 11640
 agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 11700
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuucc ucuuucuucc cuucucaucu 11760
 uauucuacuu ucuuucuuug uggucccauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 11820
 uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11876

<210> 26

<211> 11876

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: replicon RNA derived from the expression vector rFGR-JFH1/SEAP/GND

<400> 26

accugcccu aauaggggcg acacuccgcc augaaucau cccugugag gaacuacugu 60
 cuucacgcag aaagcgccua gccauggcgu uaguaugagu gucguacagc cuccaggccc 120
 ccccucccg ggagagccau aguggucugc ggaaccggug aguacaccgg aauugccggg 180
 aagacugggu ccuuucuuug auaaaccac ucuaugcccg gccauuuggg cgugcccccg 240
 caagacugcu agccgaguag cguuggguug cgaaaggccu ugugguacug ccugauaggg 300
 cgcuugcgag ugccccggga ggucucguag accgugcacc augagcaca auccuaaacc 360
 ucaaagaaaa accaaaagaa acaccaaccg acgcguaaug cugcugcugc ugcugcugcu 420
 gggccugagg cuacagcucu ccuggggcau caucccaguu gaggaggaga acccggaacu 480
 cuggaaccgc gaggcagccg agggccuggg ugccgccaag aagcugcagc cugcacagac 540

agccgccaag aaccucauca ucuuccuggg cgaugggaug ggggugucua cggugacagc 600
 ugccaggau c uaaaagggc agaagaagga caaacugggg ccugagauac ccugggccau 660
 ggaccgcuuc ccuaugugg cucuguccaa gacauacaau guagacaaac augugccaga 720
 caguggagcc acagccacgg ccuaccugug cggggucaag ggcaacuucc agaccuugg 780
 cuugagugca gccgcccgc uuaaccagug caacacgaca cgcggcaacg aggucaucuc 840
 cgugaugaau cgggccaaga aagcaggga gucaguggga gugguaacca ccacacgagu 900
 gcagcacgcc ucgccagccg gcaccuacgc ccacacggug aaccgcaacu gguacucgga 960
 cgccgacgug ccugccucgg cccgccagga ggggugccag gacaucgcu cgcagcucau 1020
 cuccaacaug gacauugacg ugauccuagg uggaggccga aaguacaugu uucgcauggg 1080
 aaccccagac ccugaguacc cagaugacua cagccaaggu gggaccaggc uggacgggaa 1140
 gaucuggug caggaauggc uggcgaagcg ccagggugcc cgguaugugu ggaaccgcac 1200
 ugagcucaug caggcuuccc uggacccguc ugugaccuau cucauggguc ucuuugagcc 1260
 uggagacaug aaauacgaga uccaccgaga cuccacacug gacccuccc ugauggagau 1320
 gacagaggcu gccucgccc ugcugagcag gaacccccgc ggcuuuucc ucuucgugga 1380
 ggguggucgc aucgaccaug gucaucauga aagcagggc uaccgggcac ugacugagac 1440
 gaucauguuc gacgacgcca uugagagggc gggccagcuc accagcgagg aggacacgc 1500
 gagccucguc acugccgacc acuccacgu cuucuccuuc ggaggcuacc ccugcgagg 1560
 gagcuccauc uucgggcugg cccugggcaa ggcccgggac aggaaggccu acacgguccu 1620
 ccuauacgga aacgguccag gcuauugcu caaggacggc gcccgggcgg auguuaccga 1680
 gagcgagagc gggagccccg aguaucggca gcagucagca gugccccugg acgaagagac 1740
 ccacgcaggc gaggacgugg cgguguucgc gcgcggcccc caggcgcacc ugguucacgg 1800
 cgugcaggag cagaccuua uagcgcacgu cauggccuuc gccgccugcc uggagcccua 1860
 caccgccugc gaccuggcgc ccccgccgg caccaccgac gccgcgcacc cggguuacuc 1920
 uagagucggg gcggccggcc gcuucgagca gacaugagu uaaaccucu cccucccccc 1980
 cccuaacgu uacuggccga agccgcuugg aaauaggccg gugugcguu gucuauaugu 2040
 uauuuuccac cauauugccg ucuuuuggca augugagggc ccggaaaccu ggcccugucu 2100
 ucuugacgag cauuccuagg ggucuuucc cucucgcaa aggaaugcaa ggucuguuga 2160
 augucgugaa ggaagcagu ccucuggaag cuucuugaag acaaacaacg ucuguagcga 2220
 cccuuugcag gcagcggaac cccccaccug gcgacaggug ccucugcggc caaaagccac 2280

guguaaaga uacaccugca aaggcggcac aaccccagug ccacguugug aguuggauag 2340
 uuguggaaag agucaaugg cucuccucaa gcguauucaa caaggggcug aaggaugccc 2400
 agaagguacc ccuuguaug ggaucugauc uggggccucg gugcacaugc uuuacaugug 2460
 uuuagucgag guuaaaaaaa cgucuaggcc ccccgaacca cggggacgug guuuuccuuu 2520
 gaaaaacacg augauaccan gagcacaauu ccuaaaccuc aaagaaaaac caaaagaaac 2580
 accaaccguc gcccagaaga cguaaaguuc ccgggcggcg gccagaucgu uggcggagua 2640
 uacuuguugc cgcgcagggg ccccagguug ggugugcgca cgacaaggaa aacuucggag 2700
 cggucccagc cacgugggag acgccagccc auccccaag aucggcguc cacuggcaag 2760
 gccuggggaa aaccaggucg cccucggccc cuauauggga augagggacu cggcugggca 2820
 ggauggcucc ugucccccg aggcucucgc ccucucuggg gcccacuga ccccggcau 2880
 aggucgcgca acguggguua agucaucgac acccuaacgu guggcuuugc cgaccucaug 2940
 ggguacaucc ccgucguagg cgcgccgcuu aguggcgccg ccagagcugu cgcgcacggc 3000
 gugagagucc uggaggacgg gguuaauuau gcaacaggga accuaccggg uuuccccuuu 3060
 ucuaucuuu uguugggccu guuguccugc aucaccguuc cggucucugc ugcccaggug 3120
 aagaauacca guagcagcua cauggugacc aaugacugcu ccaaugacag caucacuugg 3180
 cagcucgagg cugcgguucu ccacgucccc gggugcgucc cgugcgagag aguggggaau 3240
 acgucacggu guugggugcc agucucgcca aacauggcug ugcggcagcc cggugcccuc 3300
 acgcaggguc ugcggacgca caucgauaug guugugaugu ccgccaccuu cugcucugcu 3360
 cucuacgugg gggaccucug uggcggggug augcucgcgg cccagguguu caucgucugc 3420
 ccgcaguacc acugguuugu gcaagaaugc aaugcucca ucuaccugg caccaucacu 3480
 ggacaccgca uggcauggga caugaugaug aacuggucgc ccacggccac caugaucug 3540
 gcguacguga ugcgcgucgc cgaggucauc auagacaucg uuagcggggc ucacuggggc 3600
 gucauguucg gcuuggccua cuucucuaug caggagcgu gggcgaaggu cauugucauc 3660
 cuucugcugg ccgucggggg ggacgcgggc accaccaccg uuggaggcgc uguugcacgu 3720
 uccaccaacg ugauugccgg cguguucagc caugggccuc agcagaacau ucagcucuu 3780
 aacaccaacg gcaguuggca caucaaccgu acugccuuga auugcauga cuccuugaac 3840
 accggcuuuc ucgcggccuu guucuacacc aaccgcuuua acucgucagg guguccaggg 3900
 cgccuguccg ccugccgcaa caucgaggcu uuccggauag gguggggcac ccuacaguac 3960
 gaggaauaug ucaccaucc agaggauaug aggccguacu gcuggcacua ccccccaag 4020

ccguguggcg uaguccccgc gaggucugug uguggcccag uguacuguuu cccccccagc 4080
ccgguaguag ugggcacgac cgacagacgu ggagugccca ccuacacaug gggagagaau 4140
gagacagaug ucuuccuacu gaacagcacc cgaccgccgc agggcucaug guucggcugc 4200
acguggauga acuccacugg uuucaccaag acuuguggcg cgccaccuug ccgcaccaga 4260
gcugacuua acgccagcac ggacuuguug ugcccuacgg auuguuuuag gaagcauccu 4320
gaugccacuu auauuaagug ugguucuggg ccugggcuca caccaaagug ccugguccac 4380
uacccuuaca gacucuggca uuaccccugc acagucaauu uuaccaucuu caagauaaga 4440
auguauguag gggggguuga gcacaggcuc acggccgcau gcaacuucac ucguggggau 4500
cgucgcgacu ugaggacag ggacaggagu cagcugucuc cucuguugca cucuaccacg 4560
gaaugggcca uccugcccug caccuacuca gacuuaaccg cuuugucaac uggucuucuc 4620
caccuucacc agaacaucgu ggacguacaa uacauguaug gccucucacc ugcuaucaca 4680
aaauacgucg uucgauggga guggguggua cucuuauucc ugcucuuage ggacgccaga 4740
gucugcgccu gcuuguggau gcucaucuuu uugggccagg ccgaagcagc auuggagaag 4800
uuggucgucu ugcacgcugc gagugcgguu aacugccaug gccuccuaua uuuugccauc 4860
uucuucgugg cagcuuggca caucaggggu cggguggucc ccuugaccac cuauugccuc 4920
acuggccuau ggcccuucug ccuacugcuc auggcacugc cccggcaggc uuaugccuau 4980
gacgcaccug ugcacggaca gauaggcgug gguuuguuga uauugaucac ccucuucaca 5040
cucaccccgg gguauaagac ccuccucggc cagugucugu ggugguugug cuaucuccug 5100
accugggggg aagccaugau ucaggagugg guaccacca ugcaggugcg cggcggccgc 5160
gauggcaucg cgugggccgu cacuauauuc ugcccgggug ugguguuuga cauuaacaaa 5220
uggcuuuugg cguugcuugg gccugcuuac cucuuaaggg ccgcuuugac acaugugccg 5280
uacuucguca gagcucacgc ucugauaagg guaUGCgcuu uggugaagca gcucgcgggg 5340
gguaagguaug uucagguggc gcuauuggcc cuuggcaggu ggacuggcac cuacaucau 5400
gaccaccuca caccuauguc ggacugggcc gcuagcggcc ugcgcgacuu agcggucgcc 5460
guggaacca ucaucuucag uccgauggag aagaaggua ucgucugggg agcggagacg 5520
gcugcaugug gggacauucu acauggacuu cccguguccg cccgacucgg ccaggagauc 5580
cuccucggcc cagcugaugg cuacaccucc aaggggugga agcuccuugc ucccaucacu 5640
gcuuaugccc agcaaacacg aggcuccug ggcgccauag uggugaguau gacggggcg 5700
gacaggacag aacaggccgg ggaaguccaa auccugucca cagucucuca guccuuccuc 5760

ggaacaacca ucucgggggu uuuguggacu guuuaccacg gagcuggcaa caagacucua 5820
 gccggcuuac gggguccggu cacgcagaug uacucgagug cugaggggga cuugguaggc 5880
 uggcccagcc cccucgggac caagucuuug gagccgugca aguguggagc cgucgaccua 5940
 uaucugguca cgcggaacgc ugaugucauc ccggcucgga gacgcgggga caagcgggga 6000
 gcauugcucu ccccgagacc cauucgacc uugaaggggg ccucgggggg gccggugcuc 6060
 ugcccuaggg gccacgucgu ugggcucuuc cgagcagcug ugugcucucg gggcguggcc 6120
 aaauccaucg auuucacucc cguugagaca cucgacguug uuacaagguc ucccacuuuc 6180
 agugacaaca gcacgccacc ggcugugccc cagaccuauc aggucgggua cuugcaugcu 6240
 ccaacuggca guggaaagag caccaagguc ccugucgcu augccgcca gggguacaaa 6300
 guacuagugc uuaaccccuc gguagcugcc acccuggggg uuggggcgua ccuauccaag 6360
 gcacauggca ucaaucccaa cauuaaggacu ggagucagga ccgugaugac cggggaggcc 6420
 aucacguacu ccacauaugg caaauuucuc gccgaugggg gcugcgcuag cggcgccuau 6480
 gacaucauca uaugcgauga augccacgcu guggaugcua ccuccauucu cggcaucgga 6540
 acgguccuug aucaagcaga gacagccggg gucagacuaa cugugcuggc uacggccaca 6600
 ccccccgggu cagugacaac ccccacucc gauauagaag agguaggccu cgggcgggag 6660
 ggugagaucc ccuucuaugg gagggcgauu ccccuauccu gcaucaaggg agggagacac 6720
 cugauuuucu gccacucaaa gaaaaagugu gacgagcucg cggcgggccu ucgggggcaug 6780
 ggcuugaaug ccguggcaua cuauagaggg uuggacgucu ccuaauuacc agcucaggga 6840
 gauguggugg ucgucgccac cgacgccuc augacggggg acacuggaga cuuugacucc 6900
 gugaucgacu gcaauguagc ggucacccaa gcugucgacu ucagccugga cccacccuuc 6960
 acuauaacca cacagacugu cccacaagac gcugucucac gcagucagcg ccgcgggcgc 7020
 acagguagag gaagacaggg cacuuauagg uauguuucca cuggugaacg agccucagga 7080
 auguuugaca gugugugcu uuugagugc uacgacgcag gggcugcgug guacgaucuc 7140
 acaccagcgg agaccaccgu caggcuuaga gcguauuua acacgcccg ccuacccgug 7200
 ugucaagacc aucuugaauu uugggaggca guuuucaccg gccucacaca cauagacgcc 7260
 cacuuccucu cccaaacaaa gcaagcgggg gagaacuucg cguaccuagu agccuaccaa 7320
 gcuacggugu gcgccagagc caaggcccu ccccguccu gggacgccau guggaagugc 7380
 cuggcccagc ucaagccuac gcuugcgggc cccacaccuc uccuguaccg uuugggccc 7440
 auuaccaaug agguacccu cacacaccu gggacgaagu acaucgccac augcaugcaa 7500

gcugaccuug aggucaugac cagcacgugg guccuagcug gaggaguccu ggcagccguc 7560
 gccgcauauu gccuggcgac uggaugcguu uccaucaucg gccgcuugca cgucaaccag 7620
 cgagucgucg uugcgccgga uaaggagguc cuguaugagg cuuuugauga gauggaggaa 7680
 ugcgccucua gggcggcucu caucgaagag gggcagcgga uagccgagau guugaagucc 7740
 aagauccaag gcuugcugca gcaggccucu aagcaggccc aggacauaca acccgcuang 7800
 caggcuucau ggcccaaagu ggaacaauuu ugggccagac acauguggaa cuucauuagc 7860
 ggcauccaau accucgcagg auugucaaca cugccaggga accccgcggu ggcuuccaug 7920
 auggcuuca gugccgcccu caccaguccg uugucgacca guaccaccau ccuucucaac 7980
 aucaugggag gcugguuagc gucccagauc gcaccacccg cggggggccac cggcuuuguc 8040
 gucaguggcc ugguuggggc ugccgugggc agcauaggcc ugguuaaggu gcugguggac 8100
 auccuggcag gauauggugc gggcauuucg ggggcccucg ucgcauucaa gaucaugucu 8160
 ggcgagaagc ccucuaugga agaugucauc aaucuacugc cugggauccu gucuccggga 8220
 gcccuggugg ugguuggucau cugcgcggcc auucugcgcc gccacguggg accgggggag 8280
 ggcgcggucc aauggaugaa caggcuuauu gccuuugcuu ccagaggaaa ccacgucgcc 8340
 ccuacucacu acgugacgga gucggaugcg ucgcagcgug ugaccaacu acuuggcucu 8400
 cuuacuauaa ccagccuacu cagaagacuc cacaauugga uaacugagga cugccccauc 8460
 ccaugcuccg gauccuggcu ccgcgacgug ugguacuggg uuugcaccu cuugacagac 8520
 uucaaaaauu ggcugaccuc uaaaauuguuc cccaagcugc ccggccuccc cuucaucucu 8580
 ugucaaaagg gguacaaggg ugugugggcc ggcacuggca ucaugaccac ggcugcccu 8640
 ugcggcgcca acaucucugg caauguccgc cugggcucua ugaggaucau agggccuaaa 8700
 accugcauga acaccuggca ggggaccuuu ccuaucaauu gcuacacgga gggccagugc 8760
 gcgccgaaac ccccccacgaa cuacaagacc gccaucugga ggguggcggc cucggaguac 8820
 gcggagguga cgcagcaugg gucguacucc uauguaacag gacugaccac ugacaucug 8880
 aaaauuccuu gccacuacc uucuccagag uuuuucuccu ggguggacgg ugugcagauc 8940
 cauagguuug caccacacac aaagccguuu uuccgggaug agguucguu cugcguuggg 9000
 cuuaauuccu augcugucgg gucccagcuu ccugugaac cugagcccga cgcagacgua 9060
 uugaggucca ugcuaacaga uccgccccac aucacggcgg agacugcggc gcggcgcuug 9120
 gcacggggau caccuccauc ugaggcgagc uccucaguga gccagcuau agcaccgucg 9180
 cugcgggcca ccugcaccac ccacagcaac accuaugacg uggacauggu cgaugccaac 9240

cugcucaugg agggcggugu ggcucagaca gagccugagu ccagggu gcc cguucuggac 9300
uuucucgagc caauggccga ggaagagagc gaccuugagc ccucaauacc aucggagugc 9360
augcucccca ggagcggguu uccacgggcc uuaccggcuu gggcacggcc ugacuacaac 9420
ccgccgcucg uggaaucgug gaggaggcca gauuaccaac cgcccaccgu ugcugguugu 9480
gcucuccccc cccccaagaa ggccccgacg ccucccccaa ggagacgccg gacagugggu 9540
cugagcgaga gcaccauauc agaagcccuc cagcaacugg ccaucaagac cuuuggccag 9600
ccccccucga gcggugaugc aggcucgucc acggggggcg gcgccgccga auccggcggu 9660
ccgacguccc cuggugagcc ggcccccuca gagacagguu ccgccuccuc uaugcccccc 9720
cucgaggggg agccuggaga uccggaccug gagucugauc agguagagcu ucaaccuccc 9780
ccccaggggg gggggguagc ucccgguucg ggcucggggg cuuggucuac uugcuccgag 9840
gaggacgaua ccaccgugug cugcuccaug ucauacuccu ggaccggggc ucuaauaacu 9900
cccuguagcc ccgaagagga aaaguugcca aucaaccuu ugaguaacuc gcuguugcga 9960
uaccauaaca agguuguacug uacaacauca aagagcgccu cacagagggc uaaaaaggua 10020
acuuuugaca ggacgcaagu gcucgacgcc cauuaugacu cagucuuaaa ggacaucaag 10080
cuagcggcuu ccaaggucag cgcaaggcuc cucaccuugg aggaggcgug ccaguugacu 10140
ccaccccauu cugcaagauc caaguaugga uucggggcca aggagguccg cagcuugucc 10200
gggagggccg uuaaccacau caaguccgug uggaaggacc uccuggaaga cccacaaaca 10260
ccaauuccca caaccauau ggccaaaaau gagguuguu gcguggacc cccaagggg 10320
gguaagaaac cagcucgccu caucguuuac ccugaccucg gcguccgggu cugcgagaaa 10380
augggccucu augacauuac acaaaagcuu ccucaggcgg uaaugggagc uuccuauggc 10440
uuccaguacu cccugccca acggguggag uaucucuuga aagcaugggc ggaaaagaag 10500
gaccccaugg guuuuucgua ugauaccga ugcucgacu caaccgucac ugagagagac 10560
aucaggaccg aggagucau auaccaggcc ugcuccucg ccgaggaggc ccgcacugcc 10620
auacacucgc ugacugagag acuuuacgua ggaggggcca uguucaacag caagggucaa 10680
accugcgguu acagacguug ccgcgccagc ggggugcuua ccacuagcau ggguaacacc 10740
aucacaugcu augugaaagc ccuagcggcc ugcaaggcug cggggauagu ugcgcccaca 10800
augcugguau gcggcaauga ccuaguaguc aucucagaaa gccaggggac ugaggaggac 10860
gagcggaacc ugagagccuu cacggaggcc augaccaggu acucugcccc uccuggugau 10920
ccccccagac cggaauauga ccuggagcua auaacauccu guuccucaa ugugucugug 10980

gcguugggcc cgcggggccg ccgcagauac uaccugacca gagacccaac cacuccacuc 11040
gcccgggcug ccugggaaac aguuagacac ucccuaucua auucauggcu gggaaacauc 11100
auccaguaug cuccaaccuu augggguucgc augguccuaa ugacacacuu cuucuccauu 11160
cucauggucc aagacacccu ggaccagaac cucaacuug agauguaugg aucaguauac 11220
uccgugauc cuuuggaccu uccagccaua auugagaggu uacacgggc ugcgcuccuu 11280
ucuaugcaca cauacucua ccacgaacug acgcgggugg cuucagccu cagaaaacuu 11340
ggggcgccac ccucaggggu guggaagagu cgggcucgcg cagucagggc guccucuauc 11400
ucccguggag ggaaagcggc cguuugcggc cgauaucucu ucaauugggc ggugaagacc 11460
aagcucaaac ucacuccauu gccggaggcg cgccuacugg acuaauccag uugguucacc 11520
gucggcgccg gcggggggcga cauuuuuac agcgugucgc gcgcccgacc ccgcucaua 11580
cucuucggcc uacuccuacu uuucguaggg guaggccucu uccuacuccc cgcucgguag 11640
agcggcacac acuagguaca cuccauagcu aacuguuccu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 11700
uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uucuuuuuuu uuuuuuuucc ucuuucucc cuucucaucu 11760
uauucuacuu ucuuucuuug ugguccauc uuagcccuag ucacggcuag cugugaaagg 11820
uccgugagcc gcaugacugc agagagugcc guaacugguc ucucugcaga ucaugu 11876

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C12N15/63, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N7/01, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/567, C07K16/08, A61K35/76, A61P37/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C12N15/63, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N7/01, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/567, C07K16/08, A61K35/76, A61P37/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ, CAPLUS/REGISTRY (STN), JICST FILE (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Lechmann M. et al., Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice, Hepatology, 2001, Vol.34, pages 417 to 423	17, 18, 26 1-16, 19-25
Y	JP 2002-171978 A (Zaidan Hojin Tokyo-To Igaku Kenkyu Kiko), 18 June, 2002 (18.06.02), Full text (Family: none)	1-26
Y	Lim S.P. et al., Inducible system in human hepatoma cell lines for hepatitis C virus production, Virology, 2002, Vol.303, pages 79 to 99	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 March, 2005 (18.03.05)		Date of mailing of the international search report 05 April, 2005 (05.04.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003232

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IKEDA M. et al., Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells, J.Virol., 2002, Vol.76, pages 2997 to 3006	1-26

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/63, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N7/01, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/567, C07K16/08, A61K35/76, A61P37/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/63, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12N7/01, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/567, C07K16/08, A61K35/76, A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI(DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ, CAPLUS/REGISTRY(STN), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Lechmann M. et al., Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice, Hepatology, 2001, Vol.34, p.417-423	<u>17、18、26</u> 1-16、19-25
Y	JP 2002-171978 A (財団法人 東京都医学研究機構) 2002.06.18, 全文 (ファミリーなし)	1-26
Y	Lim S.P. et al., Inducible system in human hepatoma cell lines for hepatitis C virus production, Virology, 2002, Vol.303, p.79-99	1-26

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.03.2005

国際調査報告の発送日

05.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ikeda M. et al., Selectable subgenomic and genome-length dicistronic RNAs derived from an infectious molecular clone of the HCV-N strain of hepatitis C virus replicate efficiently in cultured Huh7 cells, J. Virol., 2002, Vol.76, p.2997-3006	1-26